

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-503537

(P2005-503537A)

(43) 公表日 平成17年2月3日 (2005. 2. 3)

(51) Int. Cl. ⁷		F I	テーマコード (参考)	
GO 1 N	30/88	GO 1 N	30/88	E
GO 1 N	27/62	GO 1 N	27/62	F
GO 1 N	27/64	GO 1 N	27/62	K
GO 1 N	30/48	GO 1 N	27/62	V
GO 1 N	30/48	GO 1 N	27/64	B
		審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 149 頁) 最終頁に続く		
<hr/>				
(21) 出願番号	特願2002-579773 (P2002-579773)			
(86) (22) 出願日	平成14年1月15日 (2002. 1. 15)			
(85) 翻訳文提出日	平成15年7月8日 (2003. 7. 8)			
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/001541			
(87) 国際公開番号	W02002/082051			
(87) 国際公開日	平成14年10月17日 (2002. 10. 17)			
(31) 優先権主張番号	60/262, 530			
(32) 優先日	平成13年1月17日 (2001. 1. 17)			
(33) 優先権主張国	米国 (US)			
(31) 優先権主張番号	60/262, 852			
(32) 優先日	平成13年1月17日 (2001. 1. 17)			
(33) 優先権主張国	米国 (US)			
(81) 指定国	EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), AU, CA, CN, JP, KP, KR, RU			
(71) 出願人	503246163 タブス, ケモンズ エー. アメリカ合衆国, アリゾナ州 85202 , メサ, ウェスト デル キャンプ サー クル 2327			
(74) 代理人	100079108 弁理士 稲葉 良幸			
(74) 代理人	100080953 弁理士 田中 克郎			
(74) 代理人	100093861 弁理士 大賀 真司			
(72) 発明者	タブス, ケモンズ エー. アメリカ合衆国, アリゾナ州 85202 , メサ, ウェスト デル キャンプ サー クル 2327			
最終頁に続く				

(54) 【発明の名称】 生体分子分析用ハイ・スループット統合システム

(57) 【要約】

本発明は、引き続き高性能分析用に生体材料から特定の生体分子の選択的な回収および濃縮、目標タンパク質の定量、目標生体分子の変異体（例えば、スプライス変異体、点突然変異および翻訳後修飾）の認識、それらの性質の解明、標的分子と相互作用するリガンドの分析と同定、並びに単一の統一化された、経済的な、多重並行処理プラットフォームを用いた大量サンプルのハイ・スループット・スクリーニングのできる統合システムを提供する。該統合システムの好適な実施態様は、アフィニティー・マイクロカラムのような分子トラップと、質量分析計用誘導体化ターゲットと、複数サンプル注入可能な質量分析計並びに処理／データ解析相互作用データベースを備えた自動装置とを含む。本発明はまた、個々の要素を使用するための方法とプロセス並びに生物学的適用における統合システムを含む。さらに本発明の好ましい実施態様では、複数の別々のデバイスおよび／またはサンプル調製および／または処理のためのハイ・スループット分析を達成する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

定性的かつ定量的な生体分子分析のためのハイ・スループット統合システムであって、

- a) 空間的に配列された複数のアフィニティー・マイクロカラムを取り付けたロボティック・プラットフォームと、
- b) アフィニティー・マイクロカラムと同じ空間的配列に対応する空間的配列を有する質量分析計のターゲットと、
- c) 前記空間的配列を有するターゲットを受け容れられる質量分析計と、を含むシステム

【請求項 2】

前記空間的配列が、4 から 1, 5 3 6 の要素を含む、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 3】

前記ロボティック・プラットフォームが、複数の処理ステージをさらに含む、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 4】

前記アフィニティー・マイクロカラムが、生体材料中の特定の生体分子を受容すると、前記特定の生体分子がアフィニティー相互作用により回収される、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 5】

前記質量分析計のターゲットが酵素活性を有する、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 6】

前記質量分析計が、MALDI-TOF 型質量分析計である、請求項 1 に記載のシステム

【請求項 7】

前記複数の処理ステージのうちの少なくとも 1 つが、アフィニティー・マイクロカラムを用いて、生体材料中に存在する特定の生体分子を選択的に単離するためのものである、請求項 3 に記載のシステム。

【請求項 8】

前記複数の処理ステージのうちの少なくとも 1 つが、非特異的に保持された化合物を除去するために前記アフィニティー・マイクロカラムをリンスするためのものである、請求項 3 に記載のシステム。

【請求項 9】

前記複数の処理ステージのうちの少なくとも 1 つが、選択的に保持された生体分子を質量分析計のターゲット上に置くためのものである、請求項 3 に記載のシステム。

【請求項 10】

生体材料のサンプルが複数種類存在する場合、空間的に配列された複数のアフィニティー・マイクロカラムと、該アフィニティー・マイクロカラムと同じ空間的配列に対応する空間的配列を有する質量分析計のターゲットとを用いて実質的に同時にかつ並行して前記サンプルが処理される、請求項 1 に記載のシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2001 年 1 月 17 日に出願された係属仮出願 60/262, 530 および 60/262, 852 双方の一部継続である。

発明の分野

本発明は、プロテオミクスの分野に関連する。より具体的には、本発明は生体材料から回収された生体分子の迅速な同定、並びに特性評価のための方法および装置である。さらに、本発明は、多数の異種サンプルを同時に処理する能力（ハイ・スループット分析）を含む。

【背景技術】

10

20

30

40

50

【0002】

発明の背景

ヒトゲノムの塩基配列決定法における最近の進歩は、生物科学をいくつかの新規で興味深い研究活動舞台に駆り立てた。これら活動舞台の1つであるプロテオミクスは、世界的に協調して行われる生物学的研究の次なる波であると広く考えられている。プロテオミクスは、遺伝子産物（タンパク質）、それらの多様な形態と相互作用のパートナー、およびそれらの調節と処理の動態（時間）の研究である。つまり、プロテオミクスは、自然環境で機能するタンパク質研究であり、完全ではないとしても、それらの生物学的機能についての理解をさらに深めることを全体的意図としているものである。このような研究は、遺伝的障害の背後にある機構または薬物介在療法の影響を理解するのに必須であると同時に、臨床分析および診断分析にとって根本的な基礎となる可能性がある。

10

【0003】

タンパク質の分析には幾つか固有の難題がある。何よりもまず、分析に十分関連すると考えられるいずれのタンパク質も、*in vivo*の複雑な生物学的環境または生物学的材料に存在する。これらの生物学的材料の複雑性が、一つの難題、すなわち、興味のあるタンパク質は多くの場合比較的低濃度で材料中に存在し、他の大量の生体分子、例えばタンパク質、核酸、炭水化物、脂質などによってどうしても隠されてしまう、という問題を提示する。この根本的な問題を解決するために、現在プロテオミクスに用いられている技術は、比較的旧式の技術である二次元（2D）ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）、すなわち、多数のタンパク質を、等電点と分子サイズの間接として二次元的にゲル媒体を用いて同時に移動させる技術によって、まず全生体材料を分画することのみである。予測できる挙動で移動させるために、タンパク質をまず還元して変性させるが、この工程は、タンパク質の全体構造を破壊し、それらの機能を喪失させる。

20

【0004】

現状では、最新のプロテオミクス技術も、2D-PAGEを用いて分離されたタンパク質の同定を伴う。この方法では、分離されたタンパク質を含有するゲルスポットを、ゲル媒体から切り出し、高特異性酵素（普通はトリプシン）で処理してタンパク質をフラグメントにする。次に得られたフラグメントは、エレクトロスプレー・イオン化法（ESI）或いはMALDI-TOF（matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight）型質量分析計（MS）を用いた高精度質量分析に供される。フラグメントの絶対分子量の形で得られたデータ並びに酵素の特異性についての知識が、フラグメントの経験的データに関連する情報のゲノムまたはタンパク質データベースの*in silico*検索に用いられる。過去7年に亘って改良された分析法および検索プロトコルによれば、ゲル分離タンパク質がある遺伝子に由来するものであると同定するためには、高精度に質量が測定された2、3のタンパク質分解フラグメントだけしか必要ないという点まで発展した。

30

【0005】

しかしながら、興味の対象のタンパク質を産生する遺伝子の同定は、タンパク質の構造／機能を決定するずっと多くのプロセス全体の中の第1工程にすぎない。発生する多数の問題に対して、2D-PAGE／MS法では答えることができない。1つの主要な問題は、タンパク質の一次構造と関係する。通常行われる同定プロセスの中では、タンパク質の配列の多くて50パーセントは調べられるが、少なくともタンパク質の50パーセントが分析されないままである。どのタンパク質にも、潜在的に多数のスプライス変異体（splice variants）、点突然変異および翻訳後修飾が存在するとすれば、タンパク質内に存在し、その多くが疾患状態の原因となる多数の変異体および修飾が、結局同定プロセス中で見逃されることになる。このように、タンパク質は、（正常な）機能を有する変異体を（疾患の原因となる）異常な機能を有する変異体から識別するのに必要とされる十分な細部構造が見られていない。

40

【0006】

さらに、現在の同定プロセスは、タンパク質の定量法を何ら提供しない。疾患状態の多く

50

に関して、特定タンパク質および／またはそれらの変異体濃度の増加若しくは減少は、原因となったり、指標とされたりするため、タンパク質の定量は、プロテオミクスの極めて重要な構成要素である。現在、ゲルからのタンパク質定量は、もともと比較的変動しやすい染色法を用いて行われているため、不正確である。染色法は、2D-PAGEで得られたタンパク質フラグメントの質量分析による定量に、ICAT (isotope-coded affinity tags) を組み合わせる方法によって代替できる。しかしながら、該ICAT法は、前記タンパク質変異体に対しては依然として現実性に乏しい。というのは、タンパク質変異体は、質量の変化したタンパク質フラグメントを生じ、それらは定量プロセスから除外されるからである。同様に、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) およびRIA (radioimmunoassay) などの他の方法も、変異体が存在する場合に特定のタンパク質を定量するのは同じように複雑である。変異体から目標タンパク質を分離する能力を欠くことから、これらの方法は、本質的に全てのタンパク質変異体を単一の化合物としてモニターすることとなる。疾患は、全ての変異体の累積濃度ではなくて、単一変異体のみの濃度上昇により引き起こされ／兆候となる可能性があるので、しばしば誤りを招く方法となる。

【0007】

さらに、2D-PAGE/MS法は、タンパク質ーリガンド（例えば、他のタンパク質、核酸または生体関連化合物）相互作用の探索を何ら提供しない。タンパク質分離の際、変性する条件を用いるので、全てのタンパク質ーリガンド相互作用は攪乱され、同定方法を用いた研究の対象範囲外となる。別の他の方法は、タンパク質ーリガンド相互作用の分析に特に焦点を合わせている。これらの中で最も頻繁に用いられるものには、酵母2ハイブリッド法 (Y2H) およびフェージディスプレイ法があり、それぞれ、生体分子相互作用を示すレポータータンパク質を産生する遺伝子発現を誘導する *in vivo* の分子認識現象を用いるか、または高いアフィニティを有する結合パートナーを選択的に増幅する。他の機械的方法は、検出方法として普遍的な物性またはタグ（例えば、表面プラズモン共鳴または蛍光）を利用するバイオセンサに依存する。これらの方法には、一般に時間がかかり、生体材料から引き出された相互作用するパートナーが間接的に検出されて、結合パートナーについての特定情報または同定情報をもたらしえないという2つの主たる限界がある。

【0008】

最後に、前記方法のいずれも、実験材料の大きな母集団における特定のタンパク質、それらの変異体、およびそれらの相互作用パートナーを大量かつハイ・スループットに分析するのに好ましくない。前記の全ての方法は、単一サンプルに実施するのに、数時間 (2D-PAGE) から数週間 (Y2H) 必要とする。この様に、時間と費用を費やすため、プロテオミクス、臨床および診断への応用に必要な数百から数千のサンプル (数百から数千の個体由来) への適用は不可能となる。

【0009】

現在までに、前記全ての理由のためタンパク質のハイ・スループット分析が可能な普遍的統合システムは存在してない。したがって、天然の環境に存在するネイティブなタンパク質を分析できる新しく新規な技術が早急に必要とされる。これらの技術は以下の項目、すなわち 1) 続く高速分析のために、生体材料から特定のタンパク質を選択的に回収し、濃縮する能力、2) 標的タンパク質を定量する能力、3) 標的タンパク質の変異体（例えば、スプライス変異体、点突然変異および翻訳後修飾）を認識する能力およびそれらの性質を解明する能力、4) 標的タンパク質と相互作用するリガンドを分析し、同定する能力、5) 単一の経済的なプラットフォームを用いて大量サンプルのハイ・スループット・スクリーニングを行うことができる能力、を包含する。

【0010】

個々の公表物または特許出願が具体的かつ個々に参照のために組み入れられているのと同程度に、全ての公表物および特許出願が、ここに参照のために組み入れられている。本発明は、明快さと理解を目的として図面および実施例によりある程度詳細に説明されたが、ある一定の変更並びに修飾が、添付の特許請求の範囲内で実施可能であることは明らかで

10

20

30

40

50

ある。

発明の概要

本発明の目的は、後に続く高性能分析のために行われる生体材料からの特定の生体分子の選択的な回収および濃縮、標的タンパク質の定量、標的生体分子の変異体（例えば、スプライス変異体、点突然変異および翻訳後修飾）の認識、それらの性質解明、標的生体分子と相互作用するリガンドの分析と同定、単一で統一され経済的で多重かつ並列処理プラットフォームを用いた大量サンプルのハイ・スループット・スクリーニングのできる統合システムを提供することである。

【0011】

本発明の他の実施態様は、アフィニティー・マイクロカラムのような分子トラップと、誘導体化された質量分析計ターゲットと、複数サンプルの注入が可能な質量分析計並びにハイ・スループット分析を達成する処理／データ解析相互作用データベースソフトウェアを備えた自動装置を提供することである。

【0012】

本発明の他の目的は、分子トラップ、誘導体化ターゲットなどの統合システム用の個々の要素を提供することである。

【0013】

本発明のさらなる目的は、連続調製並びに大量サンプルを同時に並列処理するために自動装置を用いる本発明のハイ・スループット実施態様を提供することである。

【0014】

本発明のさらなる他の目的は、生物学的適用において個々の要素および統合システムを利用する方法およびプロセスを提供することである。

【0015】

本発明のよりさらなる他の目的は、ハイ・スループット分析を使う統合システムを用いた分析対象物の点突然変異および変異体の同定装置および同定方法を提供することである。

【0016】

本発明の特徴とみなされる新規な面は、特に添付の請求の範囲に記載される。しかしながら、発明自体は、その構造および操作の双方に関してさらなる目的とその利点と共に添付の図面と併せて読むと本発明の好適な実施態様について以下の説明から最良に理解されるであろう。特記しないかぎり、明細書および請求の範囲中の単語および語句は、通常の意味および慣用的意味を通常の適用可能な業界の通常の当業者に与えるように意図している。他の意味が意図される場合、本明細書は、特別な意味が単語または語句に適用されていることを具体的に述べる。同様に、「好適な実施態様の説明」中の単語「機能（function）」または「手段（means）」の使用は、発明を定義する米国特許法、第112条第6節の特記条項の実施を望む意図はない。逆に、米国特許法、第112条第6節の条項が、発明を定義するために実施が求められている場合、請求の範囲は、語句「ための手段（means for）」または「ための工程（step for）」および機能を具体的に記載して、このような語句において、その機能を支持するいかなる構造、物質または行為をも列挙しない。請求の範囲が、機能を実施する「のための手段」または「ための工程」を列挙する場合でも、工程の手段を支持する如何なる構造、物質または行為もまた列挙するならば、その意図は、米国特許法、第112条第6節の条項を実施することではない。さらに、米国特許法、第112条第6節の条項が、発明を定義するために実施されるとしても、その発明は、好適な実施態様に記載される特定の構造、物質または行為にのみ限定されず、請求された機能を実施するために、いずれかの、また全ての知られた、または後に開発された等価構造、物質または行為に加え、さらに請求された機能を実施するいずれかの、ならびに全ての構造、物質または行為を含むことが意図される。

好適な実施態様の説明

後に続く高速分析用のために行う、生体材料からの特定の生体分子の選択的な回収および濃縮、目標タンパク質の定量、目標生体分子の変異体（例えば、スプライス変異体、点突然変異および翻訳後修飾）の認識、それらの性質の解明、標的生体分子と相互作用するリ

10

20

30

40

50

ガンドの分析と同定、並びに単一で統一され経済的で多重かつ並行処理プラットフォームを用いた大量サンプルの高速スクリーニングが可能な統合システムを提供する。

【0017】

該統合システムの好適な実施態様は、アフィニティー・マイクロカラムのような分子トラップと、処理ステーションと、非好適な実施態様では削除されることもある誘導体化された質量分析計ターゲット・アレイとを含み、該統合システムは、単独または複数のサンプルを注入でき、処理／データ分析相互作用のデータベースを用いることができる質量分析計により作業する。本発明はまた、生物学的適用において個々の要素および統合システムを使用する方法およびプロセスを含む。さらに、本発明の好適な実施態様は、ハイ・スループット分析を達成するために、複数の個々の装置および／またはサンプル調製および／または処理を提供する。

10

【0018】

本発明のシステムの主要な要素は、生体サンプルにおいて周囲の生体材料から特定の分析対象物を単離または回収することである。これは、分子トラップを用いて達成される。分子トラップの好適な実施態様における回収プロセスでは、生物学的サンプルを、広い表面積を有する表面に親和性レセプターを有する装置を通すよう反復的に流すことが必要となる。該親和性レセプターは、特定の分析対象物を捕捉するように選択される。ハイ・スループットの実施態様において、これらの分子トラップは、小型カラムであるアフィニティー・マイクロカラム内に形成され、それにより多数の分子トラップを並列に配置させて最小物理量を取り込む。並列配置した実施態様の好ましい形態においては、多数の分子トラップは、多岐管 (manifold) や材料のブロックのような単位成分内に含まれる。このような形態では、多岐管は多数のマイクロチャネルを有し、この中に分子トラップが収容されている。

20

【0019】

分子トラッププロセスは、分子トラップ上に配置される親和性レセプターと、生体サンプルに含まれる分析対象物とに、十分な物理的接触をさせることにより達成される。親和性レセプターは、親和性レセプターと特定の分析対象物との間の親和性相互作用を用いて特定の分析対象物を捕捉、または単離する。特定の分析対象物を捕捉後、残りの化合物または捕捉されなかった化合物を、分子トラップから遊離させるために一連のリンスを用いて洗浄する。捕捉およびリンスプロセスは、特定の分析対象物を濃縮し、アフィニティー・マイクロカラムのデッドボリュームを少なくする。

30

【0020】

特定の分析対象物が捕捉された後、それらを、アフィニティー相互作用を妨害できる少量の試薬を用いて分子トラップから溶出させる。次いで溶出された特定分析対象物を、質量分析のために、またはさらなる処理、例えば、後で行う質量分析の準備のために行われる、生反応性MSターゲット・アレイを利用した酵素的／化学的修飾などの処理のために、質量分析のターゲットプラットフォームに直接スタンプされる。次に、特定の分析対象物または高精度で検出された修飾フラグメントに対して、自動化質量分析が行われる。サンプル間の相違または標準との相違を認識できるソフトウェアが、データベースに基づく多数のサンプルの分析および構成を補助するために用いられる。また、溶出された特定の分析対象物を質量分析のターゲット上にスタンプする替りに、エレクトロスプレー質量分析計の針などのサンプル導入装置の構成要素として分子トラップを用いることにより、特定の分析対象物をエレクトロスプレー・イオン化質量分析計に直接溶出できる。

40

【0021】

本発明のハイ・スループットの実施態様は、多数のサンプルの連続調製および並行処理を行う自動装置 (ロボティックス) を用いる。特定の分析対象物を捕捉するためのマイクロカラムの使用により、上記の配列形式が可能となる。これは、マイクロカラムアレイの占める物理量および／または面積を最少にすることから、このようなハイ・スループットに理想的である。適切に配列された自動装置を備えたアフィニティー・マイクロカラムの使用は、統合されたプラットフォーム上で開始から終了まで複数サンプルを同時に調製して

50

処理でき、それによってサンプルのハイ・スループットを可能にする。具体的には、捕捉、分離および溶出の全工程は、自動装置システムまたはシステムにより管理されたマイクロカラム内で実施される。これは、生体液から特定の分析対象物を分離するために機械的／物理的手段（例えば、遠心分離、磁気または真空分離）を用い、緩衝剤でリンスする他のアフィニティー捕捉方法（例えば、ビーズ媒体を用いる）とは対照的である。多くの場合、この物理的分離は、単独に実施される必要があり、しばしば配列の秩序を攪乱すると共に並行処理配列を攪乱させる。これらの機械的／物理的手段は、マイクロカラムを使用する場合には必要ないことから、並行処理配列が攪乱されることなく使用でき、順序付けられた空間的配列は、全プロセスの間無傷のままである。最も都合のよいことには、複数の調製／分析は、通常使用される空間的アレイ、例えば、4ー、8ー、16ー、48ー、96ー、384または1536ウェルのマイクロタイタープレートのフォーマットに適合させられた自動装置を用いて連続的かつ並行して実施されることである。

10

個々の構成要素

サンプルの修飾／調製

下記の実施態様の全てにおいて、生体材料または標的分析対象物は、アフィニティー反応前かアフィニティー捕捉後のいずれかで、ただしターゲットまたはターゲット・アレイ上への溶出前に修飾または調製されることが望ましい。修飾または調製の例としては、還元、ラベルまたはタグの付加、*in situ*消化、表面上での部分的消化／修飾、pH調整などが挙げられるが、これらに限定されない。

分子トラップ

20

本発明の1実施態様における分子トラップは、親和性レセプターを結合させたマイクロカラム装置である。分子トラップを、アミノシラン化試薬などでの処理により化学的に修飾してから、多くの誘導化スキームのいずれか1つを用いて親和性レセプター結合を活性化させる。アフィニティー・マイクロカラムの使用は、他の手段によりアフィニティー捕捉を実施する場合に伴う不利な点を克服する。具体的には、ここに記載されているように、アフィニティー・マイクロカラムは、この10年間で入手できるようになった質量分析計に合わせて調整する。MALDI-TOFおよびESI質量分析計が出る前は、ポリペプチド類の質量分析（実施できる場合）は、ナノモル単位の分析対象物量を必要とし、アフィニティー捕捉により単離された場合、結合レセプターを含有する試薬をミリリットル単位必要とし、生体材料をリットル単位必要とすることが多かった。MALDI-TOFおよびESI質量分析計は低感度のものから femtomole 以上の感度のものまであり、装置を含む全アフィニティー単離の規模は、数段階に縮小できる。したがって、ここに記載されたアフィニティー・マイクロカラムは、最近の可能になった質量分析技術の感度特性を十分に利用するために考案され、製造されている。

30

【0022】

本発明のさらなる実施態様は、図6に例示するように、与えられた生体材料に特異的に好適な種々のアフィニティー・マイクロカラムを提供することである。全ての生体材料は、生体分子の組成と条件に関して全く同一ではないので、アフィニティー試薬の誘導スキームは、各生体材料中でそれぞれ異なった挙動を示す。例えば、血漿中に存在する特定のタンパク質分析対象物を回収するように適合させたアフィニティー試薬は、同じ分析対象物が異なる生体材料中に存在する場合には理想的な挙動を示さない。さらに、各生体材料により異なる緩衝剤組成および条件を用いると、目的の分析対象物と共に多数の低分子有機化合物が保持され続いて溶出されることがあり、該有機化合物は質量分析プロセスを阻止しうる。したがって、目的の分析物に対する特異性が高く、分析対象物の特性評価を妨げる可能性のある他の大分子に対する非特異的結合性が低いだけでなく、質量分析プロセス、例えばMALDIまたはESIの基礎となる物理現象を妨害する可能性のある低分子化合物の保持を最小にもするような、各生体液についてのアフィニティー・マイクロカラムを構築することが必要となる。

40

ターゲット

分析対象物は、各生体材料から回収後、本質的に微小溶出され、アフィニティー・マイク

50

ロカラムから、質量分析計に挿入されるターゲットまたはターゲット・アレイ上へ直接「スタンプ」される。この様式では、例えばタイタープレートなどの空間的アレイは、最初の複数サンプル容器からアフィニティー捕捉工程と洗浄工程、質量分析計のターゲット上に至るまでの間を通してそのまま維持される。

【0023】

さらに本発明は、アフィニティー・マイクロカラムを用いて回収されたタンパク質の自動調製および分析において、質量分析計に特別に適合させたターゲットを利用することを包含する。自動装置をハイ・スループットに組み入れるには、核サンプル間において並行プロセスの再現性が良く、且つ該並行プロセスにおいて、質量分析計のターゲット上にサンプルを堆積する位置を制御できることが必須である。これらの点が、自動プロセスに組み入れられていることを確実にするため、分析対象物の堆積領域を制御できるよう、質量分析計のターゲット上に自己組織化単分子膜（SAM）を作製する。例えば、性質が疎水性または親水性であるチオール化合物またはメルカプタン化合物を使用して、金メッキしたターゲット上に対照領域を作製する。疎水性SAMで親水性SAMを囲むことにより、ターゲット上の明確に限定された領域に水溶性サンプル（アフィニティー・マイクロカラムより）を閉じ込めるための明確な境界が造られる。この様に、並行自動装置により規定された空間的配列は、複数のアフィニティー・マイクロカラムから、自動装置による処理中ずっと用いられる空間的配列と同一にパターン化された質量分析計のターゲット上へ、（自動装置を用いて）同時に複数サンプルを溶出することにより維持できる。

【0024】

他の応用において、質量分析計のターゲットはさらに、分析対象物を処理できる反応性表面を含むように作られている。質量分析を用いる生体分子を研究する場合、分析対象物の構造に関するさらなる詳細を得るためには、しばしば化学および／または酵素学で解明する必要がある。同一試料中の分析対象物、分析対象物の変異体および修飾体を見分ける目的で、質量分析と組み合わせて特異的化學修飾または酵素化學修飾を用いる分析が特に重要である。さらに、目的の分析対象物は分析できるように残しながら、妨害物を除去するように設計された除去用相互作用を用いて溶液から妨害の可能性のある種類のものを除去することでほとんど精製する質量分析のための前処理には大きな価値があることが多い。これらの操作を実施する最も効率的な手段は、特別な処理機能に関して試薬または酵素で誘導化された質量分析計のターゲットを用いることである。

【0025】

好適な実施態様において、ターゲットまたはターゲット・アレイは、フォトリジスト技術を用いて、まず指定ターゲット領域の周囲にチャンネルをエッチングすることにより作製される。従来の電気メッキ技術またはプラズマ堆積などによって、エッチング化基板に金膜を堆積させる。この金膜は、エッチングされた輪郭に自然に沿って形成される。基板によっては、表面の金膜を堆積する際、1層以上の中間層、例えばニッケル中間層などのような層が必要とされる。次に、修飾基板表面に対し化学結合を形成または吸着できるジチオビス（スクシンイミジルプロプリオネート）（DSP）またはその誘導体などの活性化されたまたは活性化可能な試薬を、ターゲット領域に、ターゲット領域以外には結合しないように、結合する。輸送溶媒はいずれも蒸発させるかまたは除去して、活性化されたまたは活性化可能な試薬の乾燥自己組織化単分子膜（SAM）を生成する。保護層として、目的のSAM上に適当な溶媒に溶解されたデキストランなどを堆積させる。その溶媒がDMFの場合、該DMFはターゲットを真空中に置くことにより除去される。次いで、ターゲット（アレイ）は、保護層を溶かさない溶媒中に溶解されたオクタデシルメルカプタンなどの疎水性試薬で被覆される。デキストランが保護層である場合、イソプロパノールが疎水性試薬を溶解するために使用できる。ターゲットをリンスすると、非結合の疎水性試薬はいずれも除去される。活性化試薬がターゲットの領域に結合されている例においては、単にDMFでリンスすることなどにより保護層を除去することによって、該活性化試薬を使用できるようになり、これはまた保護層中または保護層上に存在するすべての疎水性試薬をも除去することになる。活性化可能な試薬がターゲット領域に結合される例に

においては、保護層を除去してから活性化試薬を用いて活性化するか、または活性化試薬を輸送する溶媒を保護層の溶解にも用いることで直接活性化するかのいずれかによって、該試薬を活性化して使用できる。第2の場合において、溶解された保護層は、続くリンスにより除去される。最後に、ポリマー、タンパク質、ペプチド、または酵素などの生体試薬または生物学的試薬が、ターゲット領域の表面に結合する。生体試薬の結合は、ターゲット領域に既に結合した活性化試薬により促進される。保護層により被覆された活性化試薬がある場合、保護層を除去してからターゲット領域に生体試薬を添加するか、または生体試薬を輸送させる溶媒を保護層の溶解にも用いて直接結合させるかのいずれかにより、生体試薬を表面に添加できる。

【0026】

上記ターゲットまたはターゲット・アレイの製造プロセスの利点は、保護層で一度被覆されたターゲットはより長い期間保存でき、消費者の裁量で使用できることである。該ターゲット・アレイの他の利点は、分析対象物処理並びに不純物の取扱いのための画定された反応性表面を提供することである。

【0027】

さらに他の同様な実施態様においては、一または複数の質量分析計のターゲットの表面を、MALDIの実施に使用されるマトリックスの結晶形成を促進してサンプル調製の質を高めることが判った試薬で誘導体化する。このようなマトリックス結晶の“シーディング (seedling)”は、全サンプル調製プロセスの自動化において非常に貴重なことが判り、ターゲットの全領域に亘り再現性の高いサンプルの生産を可能にする。

ハイ・スループット装置

ここに記載された個々の構成要素は、生体材料から回収された分析対象物のハイ・スループット分析を可能にする単一の統合システムを、一緒になって形成する。基礎的分析は、一次構造、すなわち分析物の配列を立証することから始める。分子量の単独高精度決定が、分析対象物の一次構造を立証するのに十分であることが多い。分析対象物の一次構造を立証するのにより高い精度が要求される場合は、化学的/酵素的に活性な質量分析計のターゲットを用いて、分析対象物（回収後）の質量マップを作製すると便利である。このようなマッピング手法中、分析物は、高特異性切断試薬を用いて消化されて、質量分析法を用いて分析された際に多数のシグナルが生じる。群として見た場合、これらのシグナルは、単独質量測定よりもより大きな精度と信頼性で一次構造を立証できる。また、これらのデータは、正常な分析対象物として予想されるものとは大きく異なる被検変異体、たとえばスプライス変異体などをデータベースから検索するのに用いることができる。

【0028】

同様な実施態様において、分析対象物の他の変異体は、変異の性質、位置および起源を明瞭にするためにマッピングされる。単一サンプルに存在する分析対象物と変異体は、マイクロカラムに局在化した通常のアフィニティー試薬を用いて生体材料から共に抽出され、同時に質量分析計の活性化されたターゲットまたはターゲット・アレイによるマッピングに供される。被検変異体の多くは、正常な分析対象物と高い相同性を共有することから、マッピングシグナルの多くは、分析対象物と変異体の間で共通となる。しかしながら、異常または質量シフトしたシグナルもマッピングデータ内に存在する。これらの異なるデータを用いて、切断試薬の知識と正常分析物の一次構造、三次構造、四級構造の情報とを組み合わせ、変異位置を解明することが可能である。さらに、分析物のコンポーネント残基間の質量差の知識（例えば、タンパク質中のアミノ酸、またはDNA/RNA中の核酸間の質量差）と質量シフトの正確な決定を用いて、変異体を生成した転移を決定することが可能である。このような分析は、例えば、タンパク質中に存在する点突然変異または核酸中に存在する多型現象を解明する上で大きな価値がある。同様に、可能性のある修飾基（例えば、グリカン、リン酸塩、メチル、ホルミルなど）の分子量の知識を、分析対象物の化学修飾の部位および性質を解明するためにマッピングデータと組み合わせ使用できる。最後に、特異的修飾を扱うためにデザインされた反応性ターゲットは、統合システムにおいて、分析対象物から該修飾部分を切断し、質量スペクトル中のその後の質量シフト

を見ることにより修飾部分の量（数）を決定するために使用できる。

【0029】

他の実施態様において、本発明は、生体材料中に存在する特定分析対象物のハイ・スループット定量に用いられる。このプロセスを用いて、分析対象物と内部照合（分析対象物様種）を、生体材料から回収し、質量分析を通して処理する。同一の並行処理操作において、標準サンプルを分析して、分析対象物シグナルを生体材料中に存在する分析対象物量と同等視して検量線を作製する。次いで検量線を用いて各サンプル中に存在する分析対象物量が、他のサンプルに対して相対的に増加したと判定できるか、または絶対的に決定できる。

【0030】

さらなる実施態様において、本発明は、タンパク質ーリガンド相互作用に関連する相互作用パートナーを決定するのに用いられる。本質的に、アフィニティー・マイクロカラムは、生体材料を相互作用パートナーについてスクリーニングしようとする意図で、興味対象のリガンドで誘導される。このリガンドは、生体材料から分析対象物を選択的に単離できる親和性レセプターとして作用する。単離した分析対象物は、同定のために質量分析に供する。しばしば、質量分析と生体材料中に存在する化合物の知識とから、直接的な分子量決定を介して、保持された分析物は十分に同定される。代替りの方法として、未知の分析対象物を、化学的／酵素的に活性化ターゲットを用いて消化し、生じたフラグメント（例えば、タンパク質分解フラグメント）を質量分析に供する方法を提供する。次に、正確に決定されたフラグメントの分子量（および切断特異性の知識）は、分析物を同定するための

【0031】

同様の実施態様において、タンパク質ーリガンド相互作用は、それ自体他の分析対象物を保持する特定のタンパク質を標的にするアフィニティー試薬をデザインすることにより調べられる。この様式で、タンパク質複合体を、それらの構成要素の1つを標的にすることにより生体材料から回収する。次いで前述の分析法を用いて、複合体の構成要素が何であるかと性質の詳細を明らかにする。

【0032】

本発明による具体的な実施態様を、ここで詳細に説明する。これらの実施例は、例示のためのものであり、本発明は、これらの実施態様に記載された物質、方法または装置に限定

【0033】

アフィニティー・マイクロカラムの製造

特異的または非特異的標的分析対象物について、効率的なアフィニティー捕捉、遊離、および迅速、高感度かつ正確な質量分析によりハイ・スループットが可能である生物学的に高感度なアフィニティーリガンドマイクロカラムの好適な実施態様の指示された形成について以下に記載する。下記の実施例では、生物学的に富んだ環境において安定な構成を提供するために、多数の方法、構成およびデバイスの納入について記載する。

【実施例1】

【0034】

金型を用いる多孔性ガラス分子トラップの調製—グラファイトスブレイ剥離
多孔性ガラス分子トラップは、ステンレススチール製のアニーリング用鑄型を用いた市販の広穿孔P-200ピペットチップの仕様書に規格化されている（1成形あたり0.071インチ（入口）の100～1000個の孔；2度のテーバー、グラファイト剥離剤で磨き処理）。鑄型に、ソーダ石灰ガラスの球面ビーズ（150～200 μm ；75% SiO_2 、15% Na_2O および10% CaO ）を充填し、アニーリングは、アルゴン—後部充填炉中、772℃（平衡、 $t=0$ ）から800℃（ $t=3$ 分、1分の平衡）の温度をランピングすることにより達成される。ランプ—アニーリング終了時に、鑄型をオープンから直に取り去り、多孔性ガラス分子トラップを鑄型から抜き取る。このプロセスは典型的に、高流動特性および広穿孔P-200ピペットチップの入口に取り付けるための適切な

穿孔とテーバーを有する多孔性ガラス分子トラップ（室温での多孔性ガラス分子トラップの寸法：0.061インチ（入口）、0.092インチ（長さ）、2度のテーバー）を生産する。

【0035】

好適な実施態様において、次に分子トラップを、ピペットチップの先端に挿入し、底部（狭い部分）に配置させる。分子トラップを、先端からの十分な加圧量を適用することにより固定する。ピペットチップは、固定プロセスを補助するために分子トラップの挿入前に加熱できる。

【0036】

この実施例に従って調製されたアフィニティー・マイクロカラムを用いたサンプルの質量スペクトルを図2～5に例示する。

【実施例2】

【0037】

セラミック鑄型を用いる多孔性ガラス分子トラップの製造—パイレックス
多孔性パイレックスガラス分子トラップを製造するために、セラミック鑄型を記載する。多孔性ガラス分子トラップは、セラミックの焼もどし鑄型を用いた、市販の広穿孔P-200ピペットチップの仕様書に規格化されている。ジルカー（Zircar）タイプのRプレート（4×6×1-1/4インチ）を、ジルカー社（ニューヨーク州フロリダ）から購入し、最大の平坦部にエンドミルで表面化し、CNC機械により仕上げた（2100個の孔、0.0625インチの底部カット、2度のテーバー）。ボールミル化粉末状ホウケイ酸「パイレックス」（4μmから300μmのサイズ：81%SiO₂、4%Na₂O、0.5%K₂O、13%B₂O₃、および2%Al₂O₃）で充填された4個のセラミック鑄型を炉に積重ね、パイレックス軟化点（816℃）以下までの緩やかな温度上昇ランプ（60分）を用いて最初の温度平衡を受けた。次に、該鑄型を、約パイレックス軟化点（821℃）にランプする前に30分間平衡にしてから、これを約30分間維持して多孔性ガラス分子トラップを形成した。協奏的加熱処理のために（高質シリカガラスを用いて）、鑄型を708℃までダウンランプさせ、その温度で、抜き取りのために緩やかな最終温度低下ランプ前に2～20時間（所望のエッチング量に依り）維持した。即時使用が必要の場合、ガラスクラッキングを避けるために、鑄型を適切な回収温度（一般に300℃）まで緩やかな温度低下ランプさせる。このプロセスは典型的に、高流動特性および広穿孔P-200ピペットチップの入口に取り付けるための適切な穿孔とテーバーを有する多孔性パイレックスガラス分子トラップ（室温での多孔性ガラス分子トラップの寸法：0.0625インチ（入口）、0.130インチ（長さ）、2度のテーバー）を生産する。

【実施例3】

【0038】

セラミック鑄型を用いる多孔性シリカガラス分子トラップの製造—バイコール
多孔性バイコールガラス分子トラップを製造するために、実施例2に記載されたセラミック鑄型を用いる。ジルカータイプ—Rセラミック鑄型に、粉末状「バイコール」（コーニング社）、多孔性バイコール（コーニング社）、制御多孔性ガラス（コントロールドポラス グラス社、ニュージャージー州）、（所望のフロースルー特性に依り4μmから300μmのサイズ幅：96%SiO₂）で充填して炉に積重ね、バイコール軟化点（1500℃）以下までの緩やかな温度上昇勾配で（90分）最初の温度平衡を受けてから、該鑄型を、約バイコール軟化点（1530℃）にランプする前に30分間平衡にして維持し、多孔性ガラス分子トラップを形成した。ガラスクラッキングを避けるために、鑄型を適切な回収温度（一般に約300℃）まで緩やかな勾配で温度低下させる。このプロセスは典型的に、高フロー特性および広穿孔P-200ピペットチップの入口に取り付けるための適切な穿孔とテーバーを有する多孔性バイコールガラス分子トラップを生産する。

【実施例4】

【0039】

セラミック鑄型を用いる多孔性シリカガラス分子トラップの製造—シリカゲルまたは石英

10

20

30

40

50

ガラス

シリカゲルまたは石英ガラスを用いて多孔性ガラス分子トラップを製造するために実施例 2 に記載されたセラミック鋳型を用いる。ジルカータイプ R セラミック鋳型に、粉末状多孔性シリカゲル（シグマケミカル社）または石英ガラス（コーニング社）（所望のフロースルー特性に依り $4\ \mu\text{m}$ から $300\ \mu\text{m}$ のサイズ幅： $100\% \text{SiO}_2$ ）で充填して炉に積重ね、シリカ軟化点（ 1550°C ）以下までの緩やかな温度上昇勾配（90 分）で最初の温度平衡を受けてから、30 分間平衡に維持してから該鋳型を、約バイコール軟化点（ 1585°C ）に上昇させ、多孔性ガラス分子トラップを形成した。ガラスクラッキングを避けるために、鋳型を適切な回収温度（一般に約 300°C ）まで緩やかな勾配で温度低下させる。このプロセスは典型的に、高流動特性および広穿孔 P-200 ピペットチップの入口に取り付けるために適切な穿孔とテーパーを有する多孔性バイコールガラス分子トラップを生産する。

【実施例 5】

【0040】

エッチング化多孔性シリカ分子トラップ

高多孔性シリカ分子トラップ形成は、実施例 4 で形成された多孔性シリカ分子トラップを種々の電気化学エッチング条件に曝露することにより達成される。例えば、多孔性シリカ分子トラップを無水エタノール中、水性 HF（25～50%）溶液中に入れて、エッチング電流（ $120\sim200\text{mA}/\text{cm}^2$ ）および照射（ $150\text{mW}/\text{cm}^2$ ）を 1 分から 20 分間かけることにより、水素化ケイ素表面が作成される。

【実施例 6】

【0041】

金型を用いる多孔性粉末状金属分子トラップの製造

多孔性金属分子トラップは、市販の広穿孔 P-200 ピペッタチップの仕様書に規格化されている。逆の傾斜（すなわち、前述の鋳型と比べて先端が狭い）または同じ方向のテーパーを有し、鋳型の底部（プッシュピンによる多孔性金属出口用）に位置する開口の周囲に僅かに隆起したリップ（満タン以上が必要のため）を含む金型が機械作製される。鋳型は除去できる底部プレートに支えられており、粉末状金属（例えば、真ちゅう、銅、銀、金）で充填され、各孔に補足的なプッシュピンを具備したアーバー（Arbor）プレスにより、溝のある／隆起した粉末状金属面に圧（金属粒子間に個々の接合部を形成するのにふさわしい）をかける。粉末状金属分子トラップを形成後、底部プレートを外し、プッシュピンを孔の狭い末端に入れて、鋳型から多孔性粉末状金属分子トラップを離す。多孔性粉末状金属分子トラップは、オープンでアニーリングすると、構造安定性を増して有機官能基化のための金属酸化物を形成する。

【0042】

分子トラップは、種々の各種材料およびまたは各種材料の各種組合せから作製でき、依然として本発明の範囲内にあることを認識する必要がある。材料が、それらの表面に対しアフィニティー試薬と結合できなければならない。またはアフィニティー試薬と結合するために化学的に修飾できなければならないことのみが限定要件である。最も好ましい材料または材料の組合せは、表面積が広くまたは表面積を広くするために修飾できることである。

【0043】

上記実施例は、マイクロカラムのテーパー化プロファイルを利用するが、非テーパー化または円筒カラムなどの形体を用いることができ、依然として本発明の範囲内にある。実際、ハイ・スループット実施態様において、テーパー体が製造プロセスを遅らせることから、非テーパー化体が好ましい。

分子トラップの化学活性

【実施例 7】

【0044】

多孔性ガラス分子トラップのシラン被覆／機能

10

20

30

40

50

実施例 1～6 または他の等しいプロセスにより形成された多孔性分子トラップは、化学的誘導体化（シラン化）前に種々の水、鉱酸処理、付随する水によるリンス、乾燥を組み合わせた前処理調整を受けることができる。例えば、多孔性ガラス分子トラップは、上昇温度下（典型的には水の沸点以下）で蒸留水または精製水（一般に 10 倍の体積）中に懸濁し、新鮮水を 2 回または 3 回交換して（または交換しないで）1～24 時間軌道振とうすることにより浸出させる。次いで全ての水を除去し、次の 2 種の酸処理に供する。最初に、水中の 1 N 塩酸を、上昇温度で 1 時間から 2 時間の時間で多孔性ガラス分子トラップにかけて（10 倍）、中性（または中性近く）の pH が得られるまで水でリンスする。次いで、水中 1 N 硝酸を、最初の酸処理で実施したとおり実施する。多孔性ガラス分子トラップを、室温、または真空オーブン中（100℃、1 気圧、一晚）のいずれかで乾燥する。

【0045】

次に乾燥／前処理多孔性ガラス分子トラップを、無水トルエン中、軌道振とうしながら一晚灌流下、シラン化試薬、例えば、10%シラン化試薬の N-[3-(トリメトキシシリル)プロピル]エチレンジアミンで被覆させることにより化学的に活性化して、官能基化多孔性分子トラップを生成する。シラン被覆多孔性分子トラップを、室温まで冷却させ、次いで上澄液が、ニンヒドリンおよび／またはトリニトロ安息香酸（tnba）に陰性になるまで室温でリンスする。その他、有用なシラン化試薬としては、限定しないが、アクリル酸 3-(トリメトキシシリル)プロピル、3-(トリメトキシシリル)プロピルアミン、N-[3-(トリメトキシシリル)プロピル]アニリン、N1-[3-(トリメトキシシリル)プロピル]ジエチレントリアミン、N-[3-(トリメトキシシリル)プロピル]エチレンジアミン、メタアクリル酸 3-(トリメトキシシリル)プロピル、塩化[3-(トリメトキシシリル)プロピル]オクタデシルジメチルアンモニウム、N-[3-(トリメトキシシリル)プロピル]ポリエチレンジアミン、N1-[3-(トリメトキシシリル)プロピル]カルボン酸、アミノプロピルトリエトキシシラン、3-グリシドキシプロピルトリエトキシシラン、チオールプロピルトリエトキシシラン、クロロプロピルトリエトキシシラン、オクタデシルトリメトキシシラン、オクタデシルトリクロロシラン、O-[2-(トリメトキシシリル)エチル]O'-メチルポリエチレングリコール、シリルアルデドなどが挙げられる。

【0046】

これらの反応は、反応に添加されるトリエチルアミン（TEA）を用いるなど塩基触媒により、または減圧適用下（約 1 気圧）で実施することにより促進できる。

マイクロカラムハウジング（ピペット）の製造

好適な実施態様において、非テーパー化分子トラップが用いられる場合、マイクロカラムハウジングとして用いられるマイクロピペットは、次のように修飾される：

マイクロピペットチップなどのマイクロカラムハウジングは、注入成形または当業界によく知られた他の手段などによって形成される。該ハウジングの末端部は、通常のマイクロピペットに、棚のような少なくとも 1 個の差し込み突起を与えるよう修飾されている。一実施態様において、該突起は、ハウジング末端の内径にしたがった連続棚である。しかしながら、より好適な実施態様において、該少なくとも 1 個の差し込み突起は、一つの突起物または三角形の突起物であり、より好ましくは 3 個の突起物、さらにより好ましくは 6 個の突起物である。したがって、分子トラップが、ハウジングに装填される場合、各々は、少なくとも 1 個の挿入突起に支えられている。分子トラップがハウジングに充填された後、分子トラップに直接隣接したハウジングの両側の一部は、分子トラップとわずかに摩擦接触がある程度まで内側に押し付けられる。内部に含まれる分子トラップを破壊しないようにするために、過剰に押し付けないように注意を払わなければならない。好適な実施態様において、押し付ける工程は、冷却ガス（不活性ガスが好ましい）のフローによって内部の分子トラップを冷却しながら、ハウジングの外面を加熱することにより達成される。次いで、加熱されたハウジングは、加熱された鋳型内におけるゆるやかなテーパーを用いて内側に力をかけられ、これによって分子トラップにハウジングが押し付けられる。

【実施例 8】

【0047】

パッチの官能基化

官能基化多孔性分子トラップの直接的パッチ活性化／誘導体化

マイクロカラムの直接的パッチ活性化／誘導体化は、代表的なアフィニティリガンドに結合し、環境的に安定な結合を提供する任意の反応性化学基を対象とする。パッチの活性化／誘導体化法は、非常に多くの方法で進行し、有機試薬並びに無機試薬、例えば、ホモ二官能性、ヘテロ官能性またはポリマー試薬により活性化できる一級アミン類、カルボン酸類、チオール基、スルフヒドリル、ヒドロキシル、アリル基、アジド、アルデヒド、ヒドラジド、マレイミド、トリアジンなどにより生物学的修飾のために活性化／共役化学を目標に定める。

10

【0048】

本例として、グルタルアルデヒド活性化、次いで一級アミン基と、グルタルアルデヒド多孔性分子トラップ上のアルデヒド基とのリガンドカップリングによるこれらの方法の1つを例示する。最初に、アミン官能基化分子トラップを、シアノボロヒドリドナトリウム（10 mg/mL）媒介カップリング（1時間から一晚の範囲の反応時間）を用いて、グルタルアルデヒド（0.10 Mリン酸ナトリウム中25%溶液、pH 7.8、100 mM NaCl緩衝液）とカップリングさせる。リン酸緩衝液で数回リンス後、グルタルアルデヒド・マトリックス上の活性アルデヒド基を、タンパク質抗体のような対象となるリガンドと共にインキュベートする。カップリングしなかった（過剰の）リガンドを、HBS緩衝液（10 mM HEPES、pH 7.4、0.15 M NaCl、0.005%界面活性剤 P20）で広範囲にわたってリンスすることにより除去する。この誘導体化プロセスは、高い分析対象物結合力を有する分子トラップを生成する。次に該分子トラップはP-200ピペッタチップに詰められる。

20

【実施例9】

【0049】

官能基化多孔性分子トラップのパッチアミン活性化、増幅、再活性化および誘導体化

アミン→CHO→ポリアミン→CHO→Ab

増幅によるマイクロカラムの活性化は、取扱い可能なリガンドカップリングに係る他の方法を可能にする。増幅アミン表面を作成するために、ポリリジン、アミノデキストランまたはアミン修飾スターバースト dendrimer などの中～高分子量アミンポリマー類を、種々の適切な化学により、官能基化／活性化多孔性分子トラップ表面に架橋させる。グルタルアルデヒド活性アミンマイクロカラムを、シアノボロハイドレートナトリウム介在カップリングにおいてポリリジンとインキュベートする。次に、このポリアミンマイクロカラムを、グルタルアルデヒドを用いて再度活性化し、水でリンスし、タンパク質リガンドをコンジュゲートさせる。

30

【実施例10】

【0050】

官能基化多孔性分子トラップのパッチ表面アミン修飾活性化／誘導体化による非特異的結合の抑制

アミン→CHO→ポリアミン→NHS/EDC→ポリCOOH→NHS/EDC→>リガンド

40

リガンド固定のための他のアプローチとして、表面アミンに対するリガンド由来カルボキシル基のカップリングを介するものがある。増幅アミン表面を作成する有効な方法は、高分子量のポリリジン、アミノデキストラン、アミン修飾スターバースト dendrimer またはポリアクリルヒドラジドを、官能基化多孔性分子トラップ表面に架橋させ、次いでカルボキシル末端クロスリンカー（例えば、無水コハク酸または無水グルタル酸）のEDC仲介性結合またはビスオキシラン活性化（エポキシド活性化表面になる）などの種々の化学による末端カルボキシル生成による。これらのカルボキシルマイクロカラムは、EDC/NHS仲介性の活性化／カップリングを経て低pIタンパク質リガンドを固定化するのに用いられる。具体的には、ポリリジンマイクロカラムを、無水コハク酸（またはグルタル

50

酸) (0.2 M 酢酸ナトリウム中 100 mg/mL 無水物、pH 4~5) のバルク中インキュベートして、pH を希塩酸の添加により維持しながら、一般に 2 時間から 4 時間で反応を完了 (すなわち、t n b s とニンヒドリンアミン試験陰性) させる。次にカルボキシマイクロカラムを、水中 100 mM NHS と 100 mM EDC とで室温で 10~20 分間活性化し、水でリンスし、僅かな真空をかけてからタンパク質リガンドのカップリングを行う (抗体 1~10 mg/mL、HBS 緩衝液 pH 7.5、4℃で一晩、シェーカ)。

【実施例 11】

【0051】

官能基化多孔性分子トラップのバッチ中ポリマー修飾カルボン酸の活性化／誘導体化
他の方法は、カルボキシメチルデキストランのような水溶性カルボキシル含有ポリマー類 (カルボキシメチルデキストラン、カルボキシメチルアガロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルアミロース、ポリグルタミン酸、ポリアクリル酸、カルボキシル修飾スターバーストデンドリマー) により表面増幅に次いで、第一級アミン基とデキストランマトリックス上のカルボキシル基との相互作用を経るようなリガンドのカップリングを伴う。最初に、アミン官能基化マイクロカラムを、EDC (1-エチル-3-(3ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド) 介在カップリングを経て 100 mM リン酸ナトリウム、pH 4.8、100 mM NaCl 緩衝液中で実施された 15 kDa カルボキシメチルデキストラン (CMD) にカップリングさせる。リン酸緩衝液で数回のリンス後、デキストランマトリックス上のカルボキシル基を、EDC/N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS; 水中各 100 mM) で活性化し、タンパク質抗体などの興味あるリガンドとインキュベートする。結合しなかった (過剰) 抗体を HBS 緩衝液 (10 mM HEPES、pH 7.4、0.15 M NaCl、0.005% 界面活性剤 P20) で広範囲にわたってリンスすることにより除去し、その後、分子トラップを P-200 ピペッタチップに詰める。この誘導体化プロセスは、増幅層 (CMD マトリックス) が使用されないマイクロカラムと比較して、より高い結合力のあるマイクロカラムを生成する。最初のアミノシラン化の活性化工程は、アミン表面 (事実上の官能基化表面) に結果として生じるが、結合面から離れて充填力を増すため、また、全マイクロカラムのすみずみまで均一な (均質的な) 表面コーティングを保証するために表面を増幅することが好ましい (それによって、ガラス基板に発生して非特異的結合を生じる可能性がある潜在的相互作用を減じる)。

【実施例 12】

【0052】

バッチにおけるカルボキシメチルデキストランカルボニルジイミダゾール (CDI) による官能基化多孔性分子トラップの活性化／誘導体化
リガンド固定化のための他のアプローチとして、CMD 層の EDC/NHS 活性化法を、N, N'-カルボニルジイミダゾール (CDI) の活性化に替える。この活性化法は結果として、CMD に存在するカルボキシル基とヒドロキシル基を、アフィニティーリガンドに存在する一級アミンまたはスルフヒドリルと反応できるイミダゾリルカルバマート中間体に変換する。例えば、CMD マイクロカラムを、アセトンに続いてジメチルスルホキシド (DMSO) でリンスする。次に CDI の 100 mg/mL DMSO 溶液を、CMD マイクロカラム上にのせ、真空にし、この活性化を軌道シェーカ上で 2 時間から一晩進行させる。CDI 活性化アフィニティー・ピペットを、DMSO に次いでアセトンで広範囲にわたってリンスして CDI 活性化 CMD マイクロカラムを形成する。重要なことは、CDI 活性化媒体は、正しい保存条件 (すなわち、(湿った) イソプロパノールまたは (乾燥) 不活性ガスまたは真空) を与えると月単位の貯蔵が可能なほど安定であることが知られていることである。したがって、CDI は、マイクロカラムの安定なアクチベータとして作用でき、予め活性を与えて長期間供給することができる。あるいは、CDI 活性化マトリックスを、興味のあるタンパク質抗体と共にインキュベートする。結合しなかった (過剰) 抗体を HBS 緩衝液 (10 mM HEPES、pH 7.4、0.15 M NaCl、0.005% 界面活性剤 P20) で広範囲にわたってリンスすることにより除去し、その後、

分子トラップをP-200ピペッタチップに詰める。

【実施例13】

【0053】

有機官能基化多孔性ガラス分子トラップの表面重合によるバッチ *in situ* 重合または共重合

本実施例において、有機官能基化多孔性ガラス分子トラップ（すなわち、メタクリルトリメトキシシラン化）を、フリーラジカル開始によって *in situ* で重合する。使用される典型的な共重合化モノマー類は、限定しないが、アリルデキストラン、アリルアミン、アリルグリシジルエーテル、アクリル酸、ビニルジメチルアズラクトンが挙げられ、それらは、水中のテトラメチレンジアミン（TEMED）またはN, N, N', N'-テトラメチルー1, 2-ジアミノエタンおよび過流酸アンモニウムなどの典型的な開始剤を用いて、メチレンビス（アクリルアミン）などの架橋剤に組み入れることができる。架橋およびポリマーサイズの程度は、開始剤の量、重合時間、終了用に利用できるモノマー類により制御される。この表面反応は、分子トラップ表面を覆うポリマーマトリックス内に多く存在する官能基で生じる。次にこれらの基は、リガンドに対する活性化／共役化に利用できるか、または活性化およびリガンドカップリング前に、さらなる活性化および増幅に供される。

【実施例14】

【0054】

金属キレート修飾多孔性ガラス分子トラップ

金属キレートの多孔性ガラス分子トラップへの組み入れは、金属結合性の生体分子回収に有用である。前述の実施例で調製されたアミンまたはポリアミンマイクロカラムを、pH 7の0.1Mリン酸塩に入れてロータリーエバポレータを用いて排気させる。次いで第一級アミンの表面を、エチレンジアミン四酢酸二無水物（EDTA-DA）およびジエチレントリアミン五酢酸二無水物（DTPA-DA）などの二官能性キレート化剤に20～100mg/mLで直接結合させて、生体分子を捕捉するための複合体の配位において金属をしっかりと結合できる金属キレートアーム（それぞれTEDおよびEDTA）を形成する。

【0055】

代替方法として、エチレンジアミン四リン酸（EDTPA）、1, 4, 7, 10-テトラシクロノナン-N, N', N''-三酢酸（NOTA）、1, 4, 7, 10-テトラシクロドデカン-N, N', N'', N'''-四酢酸（DOTA）、1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン-N, N', N'', N'''-四酢酸（TETA）、1, 2-ビス（2-アミノフェノキシ）エタン-N, N, N', N'-四酢酸（BAPTA）、N, N（ビスカルボキシメチル）L-リジンなどの金属キレート溶液を、例えば、NH₄SCN/EDC（各100mM、0.1Mリン酸塩、pH 7）仲介を用いて活性化し、カルボキシル基を局在化した表面第一級アミンに結合させる。

【実施例15】

【0056】

擬生体リガンド形成、バッチ染料官能基化多孔性ガラス分子トラップの調製

合成染料は、多種多様な生体物質との反応性という長所により有用なアフィニティーリガンドである。限定しないが、トリアジン染料を包含する反応性染料（すなわち、反応性黒色、反応性青色、反応性褐色、反応性緑色、反応性橙色、反応性赤色、反応性黄色など）は、例えば、簡便法を用いてアミノマイクロカラムに結合させた。対象となるトリアジン染料、シバクロン（Cibacron）ブルーの50mg/mLを蒸留水に溶解し、丸底フラスコ中のアミノマイクロカラムに加えて緩和な還流下、一晚反応させた。リガンドカップリング後、擬生体マイクロカラムを水でリンスし、1N塩溶液と緩和な還流下、30分間インキュベートした。広範囲に亘る水リンス後、擬生体マイクロカラムを、空气中または90℃減圧下のいずれかで乾燥した。

【実施例16】

【0057】

パッチイオン交換官能基化多孔性ガラス分子トラップの作製
イオン交換媒体の多孔性ガラス分子トラップへの組み入れは、生体分子結合、回収と分析
またはサンプル中の脱塩界面活性剤としての洗浄（SDS除去）にとって有用である。こ
の場合、アミンまたはポリアミンマイクロカラムは、例えば、デキストランイオン交換媒
体（例えば、硫酸デキストラン、ジエチルアミノエチルデキストラン（DEAE-デキス
トラン）、硫酸ヘパリン、カルボキシメチルデキストラン（実施例10に前述された生成
）内に含まれる炭水化物の水酸基を目的に活性化される。デキストランイオン交換担体カ
ップリング前に、第一級アミンの表面を、トリアジン、ジグリシドキシエーテル（オキシ
ラニン類またはエポキシド類）などの二官能性（または活性）剤で活性化する。同様に、
最初のシラン化反応または共重合化から生成されたエポキシド官能基化マイクロカラムを、
誘導体化用に使用する。

10

【0058】

あるいは、アミンマイクロカラムを、活性化デキストラン担体とインキュベート／カップ
リングする。さらなる実施例は、デキストラン（近接ジオール）イオン交換担体のメタ過
ヨウ素酸ナトリウム酸化により生成されたデキストラン担体上のアルデヒド基の使用であ
る。具体的には、デキストランイオン交換媒体（10～100mg/mL）を、1Mメタ
過ヨウ素酸ナトリウム（水中）中暗所で2時間インキュベートし、その後、酸化デキス
トランイオン交換媒体を、有機溶媒（エタノール／エーテル）中で沈殿させるか、または水
中で一晚透析する。次に酸化デキストランイオン交換媒体を、アミンまたはポリアミンマ
イクロカラム（0.1Mリン酸塩、pH7.5）とインキュベートする。

20

【実施例17】

【0059】

マイクロカラムへのタンパク質固定

結合特異性を有するタンパク質は、免疫化学のレセプターおよびリガンドとして専門的に
扱われている。これらのアフィニティータンパク質としては、プロテインA、プロテイン
G、アビジン試薬およびストレプトアビジン試薬が挙げられるが、これらに限定されない
。タンパク質リガンド、具体的にはプロテインAまたはGは、生体分子回収剤として使用
される前の、抗体の末端の定常部（Fc）の捕捉、または続く架橋に伴う捕捉／コンジュ
ゲートのために多孔性ガラス分子トラップに組み入れられる。アビジン／ビオチンシステ
ムは、抗体または分析対象物に結合される際に、強力な結合性のみならず増幅モチーフを
有する共役剤を作製する代替連結剤として用いられる。

30

【0060】

例えば、前述の実施例で調製されたアミンまたはポリアミンマイクロカラムを、pH7の
0.1Mリン酸塩に入れてロータリーエバポレータを用いて排気させる。次いで第一級ア
ミンの表面を、グルタルアルデヒドで活性化し（25%、4時間から24時間）、リンス
し、シアノボロヒドリドナトリウム（0.1mg/mL）仲介カップリングにおける機能的
タンパク質試薬（またはアミンまたはヒドラジド修飾ビオチン）（HBS-E P中1～
10mg/mL）に直接カップリングする。

【実施例18】

【0061】

マイクロカラムを用いるタンパク質修飾／消化

特異的修飾または消化性を有する生体分子は、生化学におけるレセプターまたはリガンド
として用いられる。これらの生体分子としては、タンパク質、ペプチド、酵素、触媒的抗
体などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0062】

例えば、トリプシン修飾マイクロカラムは、前述の実施例で調製される。トリプシンは活
性化されると、目的の分析対象物タンパク質など、タンパク質のアミノ酸配列におけるア
ルギニン点、またはリジン点のいずれかで特異的に消化する。

【0063】

40

50

代わりに、他のレセプターは、固定キナーゼによる分析対象物のリン酸化のように、2種の生体分子を単一体に共同させるのに使用できる。

ターゲットの製造

現在、商業的な製造に用いられているターゲットのデザインは、アレイ化されたおよび／または生体反応性のターゲットの精密で首尾一貫した使用を十分に支持していない。サンプル間での高度の再現性を達成することは、これらターゲットにとって大いに重要である。

【0064】

現在のデザインターゲットを利用すると遭遇する問題を修正できる少なくとも3つのターゲットデザインがある。これらデザインは次のとおりである。

10

台状ターゲット

本発明によるターゲットの第1の実施態様においては、分析対象物量を限定された領域に厳密に適用でき、ターゲットの活性領域を越えて広がる心配のない、「マッチドセット」のターゲットがある。一定量の分析対象物量は、ターゲットに形成された台の上部にメニスカスを形成し、正しく設計されていれば台の両側にしみ出ない。このメニスカス作用のため、分析対象物は、一般に約2～3 μ Lの分割容量となる。この容量は、酵素的活性領域からあふれる心配は殆どなく、約4mm²のターゲット領域を十分かつ完全に保護する。したがって、分析対象物を酵素量の種々の変化に曝すことによる不規則な消化は、ターゲットの活性面を完全に保護すること（のみ）により解消される。さらに、ターゲットを適当に湿らせたインキュベータに入れば、約2～3 μ Lの体積は蒸発しない。したがって、サンプル乾燥による不規則な消化は、台上で一定のサンプル容量を維持することにより除外される。

20

【0065】

製造において、台は、最終的に装置に導入されるより大きなターゲット（ステンレススチール製）に取り付ける金属下地のターゲット中に加工される。台の高さは、分析物拡散を避けるために必要最小限の高さと見られる基準により経験的に決められる。約0.5ミリメートルの高さで通常十分である；全てのMALDI-TOF装置の促進領域に容易に導入できる高さ（最小許容約2mm）。このように台の全寸法は、分析に、装置に由来する誤差を導入することなく、分析対象物を十分に限定するような寸法である。

【0066】

第2の実施態様は、さねはぎ継ぎ（*tongue-in-groove*）設計により装置に取り付けられる薄手の寸法の金属ターゲットを用いる。ターゲットの薄手の寸法と溝付き据え付けブラケットを有する必要性により、これらのターゲットを機械製作（機械仕上げ）することは実行不可能である。したがって、プレス法が、台を作成するために用いられる（背部からターゲットをプレスする）。プレス法は、適切な打ち抜き型の機械製作を必要とすることを特記する。

30

【0067】

適切な基材は、製造中に使用される溶媒適合性、金被覆並びに真空適合性のために経験的に決められる。最初に、基材ターゲットは、製造溶媒に適合し、高均一性のスパッター被覆ができ、ガス放出性の低いポリスチレンから作製される。しかしながら、他の重合材料を使用できる。ポリマー基材ターゲットの利点は、大量に安価に製造できることである。

40

【0068】

このタイプのターゲットの成功基準は、1）正確な表面領域に対してサンプル容量を正確に制限し、2）装置の性能を減じない、3）容易で、大量生産でき費用的に効果があるという最適の台幾何学を決定することである。

ターゲットまたはターゲット・アレイの疎水性／親水性の対比

高再現性の生体反応性ターゲットに関する第2の実施態様デザインは、活性領域のみに分析量を限定できる疎水性媒体で酵素的活性部位を対照化することである。この方法において、酵素は、一般に疎水性標的の上部に位置する金／DSP／酵素点に固定される。対照装置を製造する最も簡便な方法は、テフロンのような疎水性材料から構築することである。

50

。金サンプル領域は、マス킹／スパッター被覆プロセスによりターゲット上に置かれる。次に金領域を、我々の通常の活性化法／固定化法を用いて誘導化する。テフロン装置に関係する1つの懸念は、質量分析計内で変化することである。このような効果（イオンの除去によるサンプル段階での変化）は、質量分析デザインにおいて常に懸念されることである。MALDI-TOF分析は、非伝導性材料（例えば、石英ターゲットまたはゲル）から作られたサンプルターゲットより行われたが、サンプル充填による影響がわずかだった。これらの影響は、市販の全てのMALDI-TOF装置使用において利用できる遅延抽出法を用いてさらに最小化される。しかしながら、ターゲットによる質量分析の性能に対するいずれの混乱も、マス킹／金被覆プロセスにおける酵素的活性表面の電氣的結合を含むような方法により除去できる。

10

【0069】

対照装置の他の可能性は、親水性酵素活性領域が構築される疎水性表面を作成するために金属基材ターゲットを誘導体化することである。この方法の製造プロトコルは、前の方法よりも関連性が高い。疎水性媒体でターゲットを最初に被覆してから、マス킹プロセスを用いて、サンプル点のパターンを疎水性被覆に金被覆をする複数工程プロトコルに従う必要がある。このプロセスは、1) 金による全ターゲットのスパッター被覆、2) (必要なら) DSPによる活性化、3) 疎水性化合物の固定化、4) パターンマスクを用いてターゲットを再度スパッター、5) 新鮮な金の活性化と酵素固定、を伴う。このプロセスを用いる1つの実施例は、ターゲットを金被覆し、1-オクタデカンチオールで誘導体化することである(DSP活性化プロセスを省く)。このプロセスは、C-18誘導体化表面を作成するのに用いられた。これらの表面は、水玉により容易に観察できるように疎水性が高い。ターゲットを疎水性化合物で誘導体化したら、新鮮な金のパターンは、マス킹およびスパッター被覆により塗布される。次に新鮮な金を活性化し、例えば、DSP/デキストラン/酵素固定化法を用いて誘導体化される。このプロセスにより、疎水性媒体によって囲まれた親水性の酵素活性スポットを生じる。活性かつ疎水性領域間の視覚による対比を強調するために、単一の第一級アミンを含有し、他の化学的反応性基を含まない疎水性染料（例えば、ファストバイオレットB、メチレンバイオレット3RAX）を、C-18層の場所に使用できる。同様に、他のクラスの染料または色素系疎水性化合物を、ターゲットの活性かつ疎水性領域間の視覚による対比をさらに作るために使用できる。好適な実施態様において、イソプロパノールに溶解した親水性メルカプトウンデカン酸を、アレイ化ターゲット上にフラッシュにより微小堆積させ、乾燥し、オクタデシルメルカプタンで素早く覆って、対比させたターゲット・アレイを形成する。混合SAM適用を含んで、疎水性分析対象物またはそのいずれかの組合せのために、対比を逆転させることができる。

20

30

【0070】

このタイプのターゲットでの成功基準は、労力がきつすぎなく、または大スケール製造を禁じるようなコスト高ではない、一般誘導体化法（高コントラスト標的用）を見出すことである。

個々のターゲット（挿入物）

第3の標的実施態様のデザインは、消化後、市販の質量分析計に取り付ける基体に挿入できる個々の領域（挿入物）の使用である。この方法は、上記の「マッチドセット」に習うものである。挿入物は、台またはコントラストデザインであり、より高いコストの酵素を用いた誘導体化に経済的なものとなる（より高濃度の試薬のより少量を用いることによる）。これらのターゲット（低コスト酵素で誘導化した場合でも）は、1つずつ使用できる研究適用においてコストの点から極めて経済的である。

40

【0071】

このタイプのターゲットでの成功のためには、市販の装置に受け入れられるターゲットに取り付ける挿入物として「マッチドセット」デザインターゲットを作製する必要がある。

バイオチップおよび小型アレイターゲット

ターゲット・アレイの他の実施態様は、生体反応性表面を既存のチップ型生体分析ブラッ

50

トフォーム内／上に組み入れることである。マイクロチャネルデバイス（チップ）は、現在タンパク質分析用に用いられ、生体分子の分離（1つの面積内で）に続いて酵素処理（酵素的活性領域上の第2の面積内で生体分子を分離させることによる）並びにチップから直接MALDI-TOF分析にとって理想的なプラットフォームである。

他の活性表面、誘導体化法およびアッセイ

増幅媒体

別の実施態様において、表面増幅媒体は、ターゲット・アレイまたは酵素活性ターゲットの活性を増加させるために用いられる。増幅の1例としては、溶液ベースの重合増幅法、一工程の活性化カップリング、*in situ*誘導重合化事象を用いて実施される。これらの修飾表面は、カルボン酸またはアミン増幅剤（それ自体活性または活性化可能）を用いて一定の電荷の差を示す。

10

一般的酵素固定化キット

本発明による重要な生成物は、十分に活性化された一般的酵素固定化キットである。該キットは、アフィニティー・マイクロカラム、活性化されたまたは活性化可能なターゲットまたはターゲット・アレイ（増幅または増幅なし）および予め調製の緩衝液を含む、多くのアフィニティーマイクロビペットを包含する。該キットの目的は、エンドユーザーが、固有の酵素を用いてイン・ハウスでターゲットを誘導体化することにより、試薬を固定化するため製造元に送る必要をなくすることである。

イオン交換表面

さらに他の実施態様において、ターゲットまたはターゲット・アレイは、陽イオン交換プロセスを実施できるカルボキシメチルデキストラン（CMD）により誘導体化でき、これによって最後に、ナトリウムおよびカリウム緩衝液の存在下、タンパク質分析中、より高品質のMALDI-TOFスペクトルに導く。CMDターゲットを用いて、不必要な陽イオンは、溶液から除かれ、ターゲットを予めチャージさせるのに用いられる陽イオンに依存してプロトンまたはアンモニウムイオンと置き換わる。

20

陽イオン交換（CE）ターゲット

CE表面の値については、既に記載した；緩衝液中の不必要な陽イオン類の減少は、異成分シグナルを減少させることであり、これにより質量スペクトルの感度が増す（シグナルの均質化）。CE表面を用いることによるアルカリ陽イオン類の減少はまた、サンプル調製中マトリックスの均質性を改良できる。これらの特性は、タンパク質および核酸双方のMALDI-TOF分析に有用である。CE表面の1実施態様において、500 kDa CMDの増幅表面を用いる。500 kDa CMDは、低分子量CMDよりも高い交換力を持つため選択される。CMDの約10ピコモルは、4 mm²ターゲットの表面に固定化できると推定される。CMDの各成分は、交換のための約1、000個の原子価部位を有する（約30%のモノマーデキストランがCMDに変換）ことを考慮すると、10ナノモルの交換力は、ターゲットにとって10 mMアルカリ塩の1 μL一定分量と等しいと推定される。しかしながら、CMDターゲットの交換性は、純粋なサンプルにおける全有効性を決定するために評価されなければならないであろう。それらは、緩衝液塩の種々の濃度（0.1～10 mM）下で混合した1本短鎖DNA分子（例えば、d（T）₈）を用いてアルカリ金属除去において効果的である。DNAは、陰電荷のリン酸塩バックボーンに対するカウンターイオンとしてアルカリ金属を維持する高い傾向のため、試験アッセイに選択される。

30

40

【0072】

標準CMDターゲットを用いると、多くの生体適用に用いられる緩衝液の濃度範囲以下で交換限界に到達し易い。より強いCE機能（例えば、デキストランのクロロスリホン酸処理により生成するスルホナート基）と表面増幅をより大きくできる方法（巨視的表面（10～100マイクロメートル）を生み出す重合樹脂の適用）は、ターゲットの交換能力を、中等度から高強度の緩衝液中に存在する生体分子の分析中に経験する有害な作用を減少できるレベルに上げるために使用できる。

陰イオン交換（AE）ターゲットまたはターゲット・アレイ

50

陰イオン交換（A E）ターゲットまたはターゲット・アレイは、溶液から種々の陰イオン系界面活性剤を除くことによりサンプル精製にとって有用な、さらなる実施態様である。具体的には、タンパク質溶液におけるドデシル硫酸ナトリウム（S D S）の存在は、M A L D IーT O F分析中に常に懸念されるものである。S D Sは一般に、多くのM A L D Iマトリックスの機能に必要な結晶形成を攪乱し、したがって、サンプル調製の一部として溶液から除去する必要がある。M A L D Iプロセスに有害な作用を有する可能性のある他の陰イオンは、リン酸イオンである。

【0073】

ポリリジン増幅表面は、固有の弱い陰イオン交換性を有する。それらは、種々の濃度のS D Sの存在下、約5種のタンパク質から構成される被験混合物を分析することによる陰イオン除去に用いられる。ポリリジン表面は、関連する濃度（10ミリモル）で溶液からS D Sの除去に必要な交換能力または強度を提供できない。ジエチルアミノエチル（D E A E）交換基は、ポリリジンの替りとして使用できる。D E A Eを作成するのに3種の誘導体化スキームが可能である。第1の可能性は、ジエチルアミノエチルアミンをE D C媒介化学またはC D I活性化を用いて500kDa C M Dに結合させることである。この方法の必然的な限界は、カルボン酸基のD E A Eによる完全な飽和が必要なことである。全部の基が、D E A Eに変換されない場合、該表面は、（予想できない）陽イオンおよび陰イオンの双方の特徴を持つこととなる。第2の方法は、1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼンを用いてポリリジン表面を活性化し、ベンジルハロゲン化物を介してD E A Eを該表面に結合させることである。これは、それらのN-末端を経るペプチドを選択的に固定化するために、1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン法を用いて首尾良くなされた。しかしながら、本法が失敗する可能性がある原因は、活性化工程中、ポリリジンが重度に架橋する可能性があり、本質的にさらなる誘導化に対して不活性表面を形成することである。第3の化学は、ジエチルアミノエチルアミンをC D I活性化デキストランで増幅された表面に結合させることである。本法は、C D IーC M D誘導体化の変法であり、不均一な陽イオン／陰イオン交換性を減じると共に大きな交換能力を有するはずである。これらの調製法の全ては、S D Sの存在下、被験ペプチド混合物を用いて試み、評価された。

酵素、アッセイ、インキュベータ

酵素

他の実施態様は、組み合わせた多機能操作を達成するために生体分子の組合せを使用する。例えば、組み合わせるプロファイルは、生体分子のマッピングに続いて脱リン酸化が可能な、アルカリホスファターゼとエンドプロテアーゼのような2種の酵素の組合せである。このような適用は、例えば調節タンパク質中に存在する特定のリン酸化部位を解明する際に有用である。ホスファターゼを種々のエンドプロテアーゼと共に固定化すれば、p H依存の操作ができる表面を生成する究極の目的が達成される。活性は、商業的供給者から入手できる小さなホスホペプチドをアッセイすることにより評価できる。

【0074】

さらに他の実施態様は、蛇毒ホスホジエステラーゼ（P D）を用いるものである。部分的配列決定により、P Dでうまく誘導されたターゲットは、マイクロサテライトD N Aに存在する変異を含む短鎖D N Aフラグメントの分析に用いられるP C Rによるプライマー伸長法の特異性を、特別な次元を与える。P Dの生体反応性ターゲットへの固定は、小さなオリゴヌクレオチドを用いて活性を評価することにより達成できる。A PおよびP Dの双方に関連する研究は、本発明に従って一般誘導体プロトコルに依存する。

インキュベータ

アフィニティー・マイクロカラムと組み合わせて生体反応性ターゲットを用いるタンパク質分解消化中によく発生するのは、消化過程中、サンプルが（ターゲットまたはターゲット・アレイ上で）乾燥しやすいことである。温度範囲（25～60℃）を超えた消化を実施できる修飾オープン／インキュベータは、一定の湿度環境で生体反応性ターゲットを囲むように作製された。消化を、サンプル量のロスの殆どないこのインキュベータを用いて

1時間を超える時間で実施した。装置は小さく、また携帯でき（寸法：4インチ×6インチ×1インチ；約0.5ポンドの重量；120V）、単一温度で操作され（生体反応性アレイの大抵の適用に十分な40℃）、”マッチドセット”ターゲットを用いて1時間限りの時間で1~2μLのサンプル量を維持でき、ロボットステーションで使用できる。

【実施例19】

【0075】

生体分子の適用

尿のベータ-2-ミクログロブリン（β₂m）分析

アフィニティー・ピペットを形成するピペッタチップに詰める前に、上記実施例1に従って製造された多孔性ガラス分子トラップを、バッチ（1バッチ当たり30~50）中で活性化し、誘導体化した。酸調整後（0.05M HClで1時間、風乾）、多孔性ガラス分子トラップを、無水トルエン中10%アミノプロピルトリエトキシシラン（アルドリッチ社、ウィスコンシン州ミルウォーキー）で12時間還流処理した。次にアミン官能基化多孔性ガラス分子トラップを反応容器に入れて反応緩衝液（100mMリン酸ナトリウム、pH4.8、100mM NaCl）中、僅かな減圧下で15分間平衡を保った。平衡後、緩衝液を、15kDa分子質量のカルボキシル化デキストラン（CMD、フルカ社、ウィスコンシン州ミルウォーキー）および1-エチル-3-（3ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDC、シグマ社、ミズーリ州セントルイス）（反応緩衝液中、各10mg/mL）の混合物で置換し、空気を反応容器から再度排気した。反応を1時間進行（約20分と40分に反応混合液にEDCの2回連続添加により）させてから、終了し、リンスした。抗体カップリング前に、CMD-多孔性ガラス分子トラップを、100mMリン酸ナトリウム、pH8.0、0.5M NaClで激しくリンスした。次いで多孔性ガラス分子トラップを、EDC/N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS、シグマ社、ミズーリ州セントルイス）（水中、各100mM）で10分間活性化し、アフィニティー精製ウサギ抗ヒトβ₂m IgG（DAKO社、カリフォルニア州カルピンテリア）（20mM酢酸ナトリウム中0.1mg/mL、pH4.7）と共にインキュベートした。未結合抗体を、HBS緩衝液（10mM HEPES、pH7.4、0.15M NaCl、0.05%界面活性剤P20）で広範囲でリンスすることにより除去した。この製造プロセスにより、約1.5μLのデッドボリュームをもちながら10~100pmolに推定された結合力のアフィニティー・ピペットを得た。抗β₂mアフィニティー・ピペットは、安定で、抗体固定後、（HBS緩衝液中4℃で保存することにより）少なくとも3カ月の期間活性であることが判った。

生体液

全ての体液は、使用直前に入手した；プロテアーゼ阻害剤カクテル（PIC, Protease Inhibitor Cocktail Set III, Calbiochem, La Jolla, CA）は、β₂mのタンパク質分解の可能性を最少にするために直ちに加えられた。

涙液：ヒト涙液を、目を二重の蒸留水（ddH₂O）で洗浄することにより採取し、そのリンス液を集めた。目のリンス液の20μL量を、HBS緩衝液180μLと混合し、保存涙液溶液として用いた。この保存液を、さらに水（MALDI-TOF分析用）またはHBS緩衝液（質量分析イムノアッセイ（MSIA）分析用）で10倍に希釈した。

血漿：44.7μLのヒト全血を、無菌条件下、ヘパリン化マイクロカラム（Drummond Scientific Co., Broomall, PA）を用いてランセット穿刺指から採血し、205μLのHBS緩衝液と混合し、30秒間遠心分離（7,000xgにて）して赤血球をペレット状にした。50μL一定分量の上清を、200μLのHBSと混合し、生じた溶液をMSIA用に用いた；一定分量を、MALDI-TOF用にddH₂Oでさらに希釈（10倍）した。

唾液：ヒト全唾液を、MALDI-TOF用またはMSIA用の調製にddH₂OまたはHBS緩衝液でそれぞれ100倍に希釈した。

尿：ヒト尿を、ddH₂Oで100倍希釈によりMALDI-TOF用に調製し；HBS緩衝液での2倍希釈はMSIA用に用いられた。

質量分析免疫学的測定法 (MSIA)

MSIAは、手動式P-200マイクロピペットを用いて抗 β_2 mアフィニティー・ピペットを通して液を反復して(約20回)吸い取ることにより生体液について実施された。反復フローインキュベーション後、アフィニティー・ピペットを2mLのHBS緩衝液(200 μ Lの一定分量でHBSを吸い取ってから捨てることにより)でリンスし、次いでddH₂O(同じ洗浄と廃棄法を用いて)の1mLでリンスした。水リンスの最終廃液において、全ての残留水がアフィニティー・ピペットから追い出されたことを確認した。3 μ L一定分量のマトリックス溶液(1:2、アセトニトリル:ddH₂O、0.2%TFA中の α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸(ACCA; Aldrich, Milwaukee, WI)を、(マイクロカラムを覆うのに十分な)アフィニティー・ピペット中に吸い取ることによって、保持化合物をアフィニティー・ピペットから溶出し、その時点で、マトリックス/溶出液混合物は、直接MALDI-TOFターゲット上に堆積された。MALDI-TOF質量分析を、質量分析計を用いて実施した。要約すると、装置は、2ステージ30kV(2 \times 1cm; 15kV/ステージ)連続抽出源を用いて、イオンが、イオンガイド・ケーブルを含む1.4mのフライト管の入口に加速される。パルス化N₂レーザー(337nm)を用いて発生したイオンを、ハイブリッドシングルチャネル・プレート-3.8kVバイアス・のディスクリートダイノード・マルチプライアを用いて検出した。スペクトルは、分離のオシロスコープを用いて個々のレーザーショットをモニタリングし、捕獲中のレーザー強度(測定時)を弱めながら、平均の過渡的レコーダを用いて記録された。

定量

内部基準: ウマ β_2 m (E β_2 m)は、ヒト β_2 m (H β_2 m)と類似性が高く(約75%配列相同性)、H β_2 mとの質量差(MW_{E β_2 m} = 11402.9; MW_{H β_2 m} = 11729.7)が分解可能であり、容易に入手できることから、定量用内部基準として選ばれた。(ある地方の厩舎にて)新鮮馬尿を採取し、プロテアーゼ阻害剤カクテルで直ちに処理した。溶解度の低い化合物を、一晚冷却(4℃で)することにより尿から除き、次いで5,000xgで5分間遠心分離にかけた。次に尿を、10-kDa MWカットオフ・フィルタで20倍濃縮し、数回フィルタ交換(4枚のフィルタ/200mL尿)をしてHBSと水とで反復リンスした。200mLの新鮮な尿の処理により、10mLの β_2 mに富むウマ尿が得られ、約100回の分析用内部基準液の保存液とした。

検量線: H β_2 mの定量を実施した。要約すると、標品を、1.0mg/L保存H β_2 m溶液の0.1mg/Lの濃度への段階的希釈(すなわち、HBS中 \times 0.8、0.6、0.4、0.2、0.1)により調製した; 0.1mg/L溶液は、小数点第2位の濃度(0.01~0.1mg/L)に及ぶ同一の段階的希釈の保存液とした。また、H β_2 mを含有しないブランク溶液を調製した。MSIA用のサンプルを、標品の各100 μ Lを、100 μ Lの保存ウマ尿と200 μ LのHBS緩衝液とに混合することにより調製した。MSIAは、上記のとおり各々実施して、E β_2 mおよびH β_2 m双方の同時抽出した。10種の65レーザーショットMALDI-TOFスペクトルを各サンプルからとり、各スペクトルは標的上の異なる位置からとられた。y軸幅の上部50~80%のイオン信号を維持し、個々のレーザーショットを飽和させることを避けるために、データ獲得中は注意を払った。スペクトルを、ベースライン積分によりE β_2 mシグナルに標準化し、H β_2 mシグナルを決定した。各検定標準用にとられた10種のスペクトルの積分を平均化し、標準偏差を算出した。H β_2 m濃度に対する各標品の標準化積分の平均値をプロットすることにより、検量線を作図した。

スクリーニング: 尿サンプルを各人から採取して、プロテアーゼ阻害剤カクテルで処理し、4℃に冷却した。該尿サンプルを、分析前に直ちに5分間(5,000xgにて)遠心分離して、沈殿物質を除去した。MSIA用の調製において、尿サンプルの各100 μ Lを、100 μ Lの保存ウマ尿と200 μ LのHBSとに混合した。この処理は、標品をヒト尿サンプルに替えること以外、検量線の作成に用いられた処理と同一である。MSIAは、検量線の節で記載されたとおり実施した。

アフィニティー・ピペット評価/生体液スクリーニング

アフィニティー・ピペットを、多数容易に得られる生体液をスクリーニングすることにより評価した。スクリーンの意図は、各体液に対する非特異的結合度を測定し、非特異的結合への寄与を減じさせる他のリンス用プロトコルを簡単に調べることであった。図2aは、希釈ヒト涙液のMALDI-TOFスペクトルを示し、スペクトルはMSIA中に保持された化合物を示す。涙液に存在する高濃度のタンパク質は、MALDI-TOFスペクトルを支配する：リゾチーム ($MW_{c.a.i.} = 14,696$; $MW_{b.s.} = 14,691$) および涙液リボカリン ($MW_{c.a.i.} = 17,444$; $MW_{b.s.} = 17,440$)。他のポリペプチドシグナルは、2~5 kDa 範囲と同時に、恐らく $\beta_2 m$ による $m/z = 11,727$ Da に低強度シグナルが観測される。MSIA スペクトルは、選択的に保持された $\beta_2 m$ ($MW_{c.a.i.} = 11,729$; $MW_{b.s.} = 11,731$) によるシグナルを示し、リゾチームおよび他の非特異的化合物に係るシグナルが弱められている。図2bは、希釈ヒト血漿のMALDI-TOFおよびMSIAスペクトルを示す。血清または血漿の直接分析中に通常観測されるように、MALDI-TOFスペクトルは、アルブミン由来のシグナルにより支配される。他のより低い m/z シグナルも存在するが、 $\beta_2 m$ シグナルは観測されない。MSIA スペクトルは、選択的に保持された $\beta_2 m$ による強いシグナルを示し、非特異的化合物による2、3の他のシグナルを示す。図2cは、希釈唾液 (MALDI-TOF) およびMSIA中に保持された唾液のタンパク質を示す。MALDI-TOFスペクトルは、ペプチド領域が最も目立つ、1~18 kDa 範囲の多数のシグナルを示し； $\beta_2 m$ に対応するシグナルは観測されない。正常なリンスプロトコルを用いて得られたMSIAスペクトルは、選択的に保持された $\beta_2 m$ および多数の低分子質量範囲の非特異的化合物によるシグナルを示す。0.05%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) での追加のリンスにより、HBS リンスと ddH₂O リンスとの間に含まれる第2のMSIA分析を実施した (図2c)。SDS リンスは、低質量シグナルを完全に除去しなかったけれども、 $\beta_2 m$ シグナルの比例した減少なしに質量スペクトルに対するそれらの寄与を大きく減じた。図2dは、ヒト尿の分析から生じるスペクトルを示す。MALDI-TOFスペクトルは、ペプチド領域に多数のシグナルを示し、 $\beta_2 m$ シグナルは存在しない。MSIA スペクトルは、非特異的化合物の2、3の追加シグナルと共に $\beta_2 m$ シグナルが支配する。

【0076】

アフィニティー・ピペットに使用される多孔性ガラス分子トラップは、生体液のスクリーニングにおいてうまく機能した。アミン官能基化多孔性ガラス分子トラップの中間体CMD増幅は、抗体のカップリング用に複数の取り付け点 (カルボン酸基) を有する大きな親水性表面を提供した。その結果、各アフィニティー・ピペットの抗体装填は、抗体の飽和なしに $\beta_2 m$ の低濃度を捕捉するのに十分すぎるくらいである。また、親水性表面を、水性イオン性緩衝液でのリンスにより、たいていの非特異的結合化合物を含まないように洗浄できる。唾液サンプルを除いて、MSIAは、 $\beta_2 m$ 由来のシグナルを圧倒的に示しながら、ほどよく明瞭な質量スペクトルを示した。唾液スクリーンのSDS洗浄は、スペクトルの品質を改善するが、非特異的化合物の全てを完全に除去しなかった。類似の調査において、これらの化合物 (リゾチーム、 α -デフェンシン、ヒスタチンとして質量により同定された) は、約10のpIを有することが判り、HBS緩衝液の中等度のpH (7.8) および塩含量 (150 mM NaCl) により破壊されない電荷相互作用 (遊離カルボキシル基との) による保持を示唆する。したがって、唾液スクリーンが、生物学的に重要と思われる場合、他のリンスの組合せ (例えば、高度塩または各種界面活性剤) を調べる必要がある。しかしながら、非特異的化合物の存在 (サンプルのいずれかに) が $\beta_2 m$ の明瞭な決定を妨害することなく、特徴的な分子質量における直接検出によって同定されたことは特記に値する。

定量

MALDI-TOFを用いるタンパク質の定量は、多様なレーザー強度および分析対象物イオンシグナルの変動を引き起こすサンプル組成のスポットスポットの相違を償うために内部基準の使用を必要とする。分析対象物のタンパク質と違った特徴を有するタンパク

10

20

30

40

50

質は、内部基準（混合物から直接的タンパク質定量中、またはビーズ・アフィニティー媒体から溶出されたペプチドに対する内部基準標準の添加によりアフィニティー回収種のMALDI-TOF定量中に示されるような）として使用できるが、レーザー脱離/イオン化中に分析対象物と類似の挙動をする内部基準が一般に好ましい。この必要条件是、標的タンパク質と配列相同性を有する内部基準を選択することによりMSIA中に満たされる：標的タンパク質の酵素的/化学的修飾による改造、標的タンパク質の切断/伸長組換え体、同位元素に富んだ媒体（例えば、 ^{15}N または ^{18}O ）に組換え的に発現された（同じ）標的タンパク質、各種生体種と同じタンパク質。レセプターが、標的タンパク質および内部基準の両方を捕捉できると、MSIAは、単独レセプター系の周囲をデザインできる。別途に、1種のレセプターが標的タンパク質を回収するのに用いられ、別種のレセプターが内部基準を回収するのに用いられる2種のレセプター系を想定することができる。

【0077】

ここで選ばれた内部基準は、ウマ $\beta_2\text{m}$ （E $\beta_2\text{m}$ ）であり、これはヒトの対応物と75%の相同性を有し、H $\beta_2\text{m}$ よりも約300Da低い（したがって、両種は、類似の特徴を分け合い、質量スペクトルにおいて容易に分析される）。例えばポリクローナル抗 $\beta_2\text{m}$ IgGとH $\beta_2\text{m}$ またはE $\beta_2\text{m}$ との間の相対解離定数のデータが判らなくても、予備的研究により、抗体が、両種を保持するのに十分な交差反応性を表すことが示された。図3aは、0.01~1.0mg/Lの濃度範囲でH $\beta_2\text{m}$ 標品のMSIA分析を表すスペクトルを示す。E $\beta_2\text{m}$ シグナルに標準化された各スペクトルは、各検定点にとられた10種の65レーザーショットスペクトルの1つである。H $\beta_2\text{m}$ 濃度に対する各標品の10回の標準化H $\beta_2\text{m}$ 積分値平均をプロットして、図3bに示された検量線となる。データの一次回帰フィッティングにより、 $S/N > 3$ の0.0025mg/L（210pM）の検出作業限界および0.01mg/L（850pM）の定量限界で、 $I_{\text{H}\beta_2\text{m}}/I_{\text{E}\beta_2\text{m}} = 4.09[\text{mg/L中のH}\beta_2\text{m}] + 0.021$ （ $R^2 = 0.983$ ）を得る。検量線上のすべての点において、標準誤差は約5%であった。

尿サンプル中の $\beta_2\text{m}$ の定量決定

10検体のサンプルを、4人から採取した：女性（31才、妊娠；サンプル1検体（F31））、男性（30才；2日にわたりサンプル4検体（M30））、男性（36才；2日にわたりサンプル2検体（M36））、男性（44才；2日にわたりサンプル3検体（M44））。サンプルを採取した時、各人全て良好な健康状態であった。10検体の尿サンプルのMSIAによる結果を図4に示す。棒線は、各サンプルで決定された $\beta_2\text{m}$ 濃度を示し、各棒線上の挿入スペクトルは、E $\beta_2\text{m}$ に標準化されたそれぞれのH $\beta_2\text{m}$ シグナルを示す。10検体のサンプルに関するデータは、 $0.100 \pm 0.021\text{mg/L}$ （High = 0.127mg/L ；Low = 0.058mg/L ）の $\beta_2\text{m}$ の平均濃度と著しい一致を示す。追加分析を、最近腎感染を受けた86才の高齢女性（F86）から得た尿サンプルに対して実施した。このサンプルに見出された $\beta_2\text{m}$ の著しく高い濃度のために（挿入スペクトルを参照）、検量線の動的範囲内の $\beta_2\text{m}$ シグナルを維持するために、またF86の $\beta_2\text{m}$ 濃度（ $3.23 \pm 0.02\text{mg/L}$ ）を正確に確立するために尿を定量的に10倍希釈する必要があった。

翻訳後修飾

MSIAの質量選択的検出は、尿中に存在し得る $\beta_2\text{m}$ の変異体の発見と定量を可能にする。第2に、尿サンプルの定量的スクリーニング中、より高い分子質量種（ $\Delta m = +161\text{Da}$ ）が、 $\beta_2\text{m}$ と共に抽出された。この種は、恐らく $\beta_2\text{m}$ のグリコシル化体（1つはヘキソース）であり、F86に最も顕著に観察される。図5は、F86（20倍希釈）およびM36（希釈なし；比較用）の尿からとられた2種のMSIAスペクトルの重なりを示す。グリコシル化 $\beta_2\text{m}$ の濃度は、M36よりもF86において非常に大きい。グリコ- $\beta_2\text{m}$ の上昇濃度の具体的な原因は、現在のところ確かでない。

【0078】

以前の研究では、グリコシル化H $\beta_2\text{m}$ を、妥当な高濃度でドープした血清の直接MALDI-TOF分析によりグリコシル化H $\beta_2\text{m}$ の定量を報告した。不十分な質量スペクト

10

20

30

40

50

ルの分解能および血清の妨害により、曲線フィッティング作業 (fitting routine) は、複数の $H\beta_2m$ グリコ体のシグナルがもつれないために用いられ、次にその積分を、妥当な線形性 ($R^2 = 0.88$) の検量線の作図に使用するために、野生型 β_2m に標準化していた。しかしながら、本明細書に示されたデータは、著しく良好で、フィッティング作業の補助なしで厳密な定量を明確にサポートできるが、未修飾の β_2m に関して作図された検量線が、グリコシル化 β_2m の厳密な定量に直接利用できるかは確かでない。このような相関性には、両方の β_2m 体のアフィニティー定数および脱離/イオン化効率が等しいことが必要である。アフィニティー定数に関しては、ここに用いられるアフィニティー精製ポリクローナル抗体は、幅広い交差反応性 ($H\beta_2m$ と $E\beta_2m$ の共抽出により例示されるように) を示し、それで、双方の $H\beta_2m$ 体は、類似効率で抽出される確立が高い。同様に、単独の炭水化物部分の添加は、相対的脱離/イオン化効率を厳密に減ずることはないはずだ。その結果、グリコシル化 β_2m 体の濃度は、健康な各人からの尿サンプル中の野生型 β_2m と概略的に同じ濃度の 0.072 mg/L における β_2m 検量線を用いて推定され得る。

【0079】

野生型とグリコシル化 β_2m の両者が、単一の検量線を用いて定量できるかということにかかわらず、MSIAにおいて決定された野生型 β_2m の濃度は、厳密に野生型 β_2m の濃度のみを表していて、両種を合わせたものではないということが特に重要である。したがって、MSIAは、標的分析対象物の類似形体間を識別できない他の方法に優る特別の利点を有している。そこで、上昇した β_2m 濃度は、免疫系活性の一般的な指標として用いられ、一方、 β_2m グリコシル化は、より特定の疾患 (例えば、透析関連のアミロイドシスに関連する進行性グリコシル化最終生成物 (advanced glycosylated end-products)) と関連し、MSIAは、これらの独立の寄与因子を巻き込むことがないようにし、特定のバイオマーカーを特定の疾患に、より正確につなげる結果となる。

【0080】

本報告に用いられ製造プロセスは、 $10 \sim 100 \text{ pモル}$ の推測結合力を有し、一方、約 $1.5 \mu\text{L}$ のデッドボリュームを有するアフィニティー・ピペットを生成した。この結合/溶出比は、生体液に見られる β_2m 濃度と十分に見合うことが判った。さらに、アフィニティー・ピペットを用いる β_2m の効率的な捕捉は、サンプリング量を減少させた (生体液 $100 \mu\text{L}$ 未満)。さらに、ここで用いられるアフィニティー・ピペットの化学は、4種の生体液のうち3種が非特異的結合を殆ど示さず、4番目 (唾液) でさえも分析上の妨害を分析に導入しなかった。

【0081】

MSIAの定量能力は、本発明に明確に例示される。ここで調べられた β_2m の濃度範囲 ($0.010 \sim 1.0 \text{ mg/L}$) は、全ての体液の β_2m 濃度を扱うのに十分である。良好な線形性が、約5%の総誤差で2つの10単位の幅 ($R^2 = 0.983$) 以上で観察される。適切な基準標品の選択は、正確な定量にとって重要であり、本実施例において、 β_2m に富んだウマ尿の使用により満たされた。しかしながら、例えウマ尿が理想的なバックグラウンド媒体と見られても (緩衝液よりも真の分析材料をより近く模倣するため)、大多数のサンプルを長時間に亘って分析する場合、将来の分析において首尾一貫性を保証するために精製した $E\beta_2m$ に置き換える必要がある。

【0082】

ここに示したスクリーニング研究は、臨床試験とみなされるほどには十分に広範囲にわたっていないが、尿サンプルのような生体サンプルで直接 β_2m を正確に同定並びに定量する上でのMSIAの有用性を例示している。このプロジェクトに尿を提供したベースラインの4人は、 β_2m と関連する知られた遺伝的疾患を有さず、または分析に先立つ1ヵ月以内に如何なる病気にも罹っていないことから健康であると考えられた。サンプルから保持された β_2m の定量評価により、タンパク質の野生型配列に対応する分子質量を持つ β_2m の単一シグナルが明らかとなった (0.02% 以内の実験誤差、 $E\beta_2m$ シグナルを用いることにより内部で補正されたスペクトル; 図4参照)。群内の定量分析は、他の研

10

20

30

40

50

究の対照群で見出されたものと一致し、著しく一定した $\beta_2 m$ 濃度を示した。対照として、健康状態の良くない老人から得られた尿サンプルは、尿中 $\beta_2 m$ 濃度が著しい増加（約 30 倍大きい）を示した。この推定は、質量スペクトルで容易に検出できる $\beta_2 m$ の高質量変異体からの妨害なしでなされたことを特記する必要がある（図 5）。質量スペクトル中の 2 本の質量シフト（依然として関連する）シグナルの観測に関する最も妥当な説明は：1）野性型タンパク質、2）遺伝的多型または翻訳後修飾により存在する変異体、の存在である。この具体的な場合において、変異体は、 $\beta_2 m$ のグリコシル化体として +161 Da の質量シフトにより最も容易に同定される；遺伝的多型による変異体は、質量シフトがいずれの一塩基多型（すなわち、[TGG]→[GGG]、結果 Trp→Gly；dm=129.15 Da）から生じる質量シフトよりも大きいので本質的に除外される。しかしながら、遺伝的多型の結果として有意な質量シフト（>15 Da）を所有する変異体がサンプルに存在したなら、それらはグリコシル化 $\beta_2 m$ として認識されたであろう。

10

【0083】

最後に、その MSIA では、分析はかなり迅速に、比較的容易に実施されるので、この方法は分析法の迅速な開発や多数のサンプル分析に特に役立つ。分析の迅速さにより、完了したばかりの実験結果を分析する際、インキュベーションやリンスのプロトコルにおける変更が容易に実施できるリアルタイム法開発の可能性が開かれる。ひとたびこれらの方法が開発され、最適化されると、それらは、生体液のスクリーニングに容易に応用することができた。ここでサンプルは、約 3 種/時間の速度で分析され、所与の個人における数回の分析実施が 1 日以内で可能となった（図 4、M30 に示す）。この分析速度は、複数サ

20

統合自動装置

図 7 a の質量アクセシシステムは、1 つ以上の機能的プレステーション、使用ステーション、分析ステーションおよびポストステーションを含むコンジットシステム内にあるアフィニティー・マイクロカラムによる新しい生体（n a s c e n t）液分析対象物のハイ・スループット抽出用システムである。プレステーションは、サンプル情報を開始し、プレワークステーションおよび分析ワークステーション使用のために成分サンプルアレイおよびターゲットの組織化、調製、調合を行う。入ってくる生体液について、サンプル同定を行うが、これにより生体サンプルタイプ（血液、尿、細胞培養液など）などの最初のサンプルパラメータ、患者の病歴、病態、化学的パラメータプロフィール（pH、濁度など）などが確認され、最終出力分析データによる統合化のためのサンプル分類データベースがもたらされ、適合とフィードバックのデータベースを促進する。プレステーション高速液体操作およびそれに続く標識化と追跡により、サンプル源からの同定された生体液は区分された個々のサンプル採取アレイへと分配され、追跡のため標識化（例えばバーコード/レーザー読取）され、さらに適切な希釈または修飾（pH、界面活性剤の添加など）などのインライン操作が行われる。プレステーション、のもう 1 つの機能は、アレイ成分の調合および装填である。ここで、限定しないが、固体成分（プラスチック、ガラス、金属など）、液体試薬、ターゲットなどの成分アレイが形成され、および/または適切なアレイへと分配され、初期ワークステーションへと装填される。プレステーションから分子トラップのアレイは開始/貯蔵/サンプルステーション、初期ステーションによってアクセスされるか、またはサンプル処理のための使用ステーションへと再配置される。

30

40

【0084】

プレステーションで行われる処理の例としては、限定しないが、多孔性分子トラップをア

50

フィニティー・ピペットへと組み立てること、アレイ標識化、サンプル調製、サンプル修飾が挙げられる。これらの処理は、個体サンプルアレイ（プラスチックマイクロタイターなど）、アレイ標識、化学的／修飾試薬（例えば、貯蔵試薬、活性化試薬、緩衝剤、界面活性剤、還元剤など）、リンス液（緩衝液、超純水など）、脱離液（MALDIマトリックス、酸、塩基、界面活性剤など）および分析ターゲットを用いて行われる。

【0085】

プレステーションは、リガンドと分析対象物の別々のマイクロカラムによる活性化機能、サンプル回収／分離機能、およびサンプル移送／溶出機能が組み合わされている。好ましくは、複数サンプルがプレステーションに装填され、サンプル1検体が分子トラップ配列中の一分子トラップに対応するよう、該複数サンプルは分子トラップアレイに一致させて空間的に配置される。

10

【0086】

サンプルの配列は、プレステーションから自動的に使用ステーションへと再配置される。使用ステーションは、そこに含まれるサンプルおよび特定の分析対象物が処理される場所である。一実施形態において、分子トラップアレイの一端はサンプルまで下げられ、この同じサンプルが各分子トラップ内へと引き込まれる。各分子トラップは、分子トラップの表面に配置された親和性レセプターを有するので、サンプルを分子トラップに引き込むと、親和性レセプターにより探索された特定の分析対象物のいずれかに接触する。アレイ内の各分子トラップは、アレイ内の他の分子トラップの親和性レセプターとは異なった親和性レセプターを有し得るため、同一のまたは異なった媒体からの種々の特定分析対象物を標的にすることが可能となる。サンプル物質は、分子トラップ内へ1回、または数回引き込まれ得る。十分な特定分析対象物をアレイ内の分子トラップにより捕捉した後、残りの、すなわち捕捉されなかった媒体を少なくとも1回リンスで洗い落とす（しかし、他の実施態様ではリンス工程を必要としないこともある）。非標的化合物を洗い落した後、アフィニティー相互作用を阻止するために選ばれた溶液に、捕捉された特定の分析対象物を接触させることにより、それらを分子トラップから溶出する。溶出した特定の分析対象物は次に質量分析のため、直接調製するか、またはさらに、例えば、酵素的／化学的修飾などの処理のために調製してから、引き続いて質量分析のために調製する。プレステーションは、化学的修飾、分子トラップ、官能基化、生体液分析および／または移送のために複数の箇所から成り得る。最後に溶出した特定の分析対象物は、それらをターゲット・アレイにスタンプすることによりターゲット・アレイへと再配置される。

20

30

【0087】

図7bを参照して、使用ステーションの好適な実施態様はさらに、分子トラップのアレイが取り付けられたマイクロカラムのマニフォールドを含む。該マイクロカラムマニフォールドは、自動装置のヘッドに取り付けられ、これが各処理ステーションの間、分子トラップのアレイを物理的に動かす。マイクロカラムマニフォールドの物理的運動は、直角（xy）または円形（回転）の挙動と成り得る。あるいは、使用ステーション内のマイクロカラムマニフォールドは静止し、処理ステーションは分子トラップのアレイの下に再配置されていてもよい。上述したマイクロカラムアレイの物理的運動と同様に、処理ステーションの物理的運動は、直角（xy）または円形（回転）の挙動と成り得る。さらなる実施態様では、マイクロカラムマニフォールドと処理ステーション双方が、共に物理的運動をすることが考慮されている。

40

【0088】

好適な実施態様では、ターゲット・アレイは、少なくとも1個のターゲット・アレイを含有できる貯蔵／装填ステーションへと自動的に再配置される。貯蔵／装填ステーションから、ターゲット・アレイは、相互作用データベースを用いて、複数サンプルの入力と自動的処理／データ解析のできる自動化質量分析計へと移送される。

【0089】

自動化質量分析計は、特定の分析対象物、または、高精度で検出された修飾フラグメントで実施される。サンプル間の、または標準からの差異を認識できるソフトウェアが、多数

50

のサンプル分析に役立てるために使用され、新規情報システム、すなわち構造機能システム、臨床システム、診断システムおよび生化学的システムを確立する土台となる適切なデータベースを生み出す。生化学的システムとは一般的に生物器官内に見出されるタイプの分子に関与し、酵素的反応、結合反応、シグナル反応、その他の反応などの生体系に生じる異化反応およびタンパク質同化反応の全範囲を含む。他に生化学的システムは、具体的な生化学的相互作用を模倣したモデル系を含む。本発明の実用において、興味ある本発明の文脈内に示される例としては、例えば、レセプターリガンド相互作用、タンパク質-タンパク質相互作用、酵素-基質相互作用、細胞信号経路、輸送反応、遺伝子型分類、表現型分類が挙げられる。

【0090】

質量分析による分析後、ターゲット・アレイは質量分析に続くサンプル処理、またはさらなる分析のためにポストステーションへ移送できる。

【0091】

したがって、一態様では、本発明はレセプター分子とそのリガンドとの間の相互作用に影響を及ぼすリガンドまたは化合物のスクリーニングに有用であろう。

インロボット官能性

【実施例20】

【0092】

官能基化多孔性分子トラップの自動装置におけるアミン活性化／誘導体化

別の方法は、上述したフォーマットの自動装置統合化を伴い、その過程で、自動装置における協調された活性化／誘導体化に、グルタルアルデヒド活性化およびリガンドカップリングなどのプロトコルが使用される。ここでアミン官能基化多孔性ガラス分子トラップは、乾燥装填／据え付け（手動または機械補助で）され、温式P-200幅口径ピペット・アフィニティー・ピペット（Roggin Corp.）となり、プラスチック96ラックに装填される。このラックは6ステージ自動装置のステージ1上へと組み込まれ、種々のカップリング溶液およびリンス溶液を含有するマイクロタイタープレート（マイクロタイター）を装填し、これをパーソナルコンピュータにつなぎ、ソフトウェアで制御する。グルタルアルデヒドのアミンマイクロカラムへのカップリングは、1ウェルにつき0.10Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.8中の25%グルタルアルデヒド溶液110μLを含有する位置2にある96ウェルのマイクロタイタープレートからの、100回の反復吸引を用いて生じる。この最初のカップリングは、ステーション3（第2の96ウェルのマイクロタイタープレート（含有、50回の反復吸引）で達成される広範囲のHBS緩衝液リンス（110μL／ウェル）を必要とし、これにより迅速な自動装置媒介活性化カップリング（反応時間10～20分）を生じる。ステーション4（約50回の反復吸引）での最終の水リンス後、グルタルアルデヒド・マトリックス上の活性化アルデヒド基は、ステーション5（0.1～1mg/mL、55μL／ウェル、約200回吸引）で、興味のあるタンパク質抗体とインキュベートされる。カップリングしなかった（過剰）抗体は、ステーション6でHBS緩衝液（10mM HEPES、pH 7.4、0.15M NaCl、0.005%界面活性剤P20、50回の反復吸引）を用いた徹底的なリンスにより除去する。

【実施例21】

【0093】

自動装置におけるアミンマイクロカラムのアミン活性化、増幅、再活性化および誘導体化上に示した方法の拡張の1つは、グルタルアルデヒドの活性化に、続く自動装置における増幅と、リガンドカップリングに先立つ再活性化とを自動装置統合化するもので、自動装置にける協調した活性化／増幅／誘導体化を行うものである。本実施例では、アルデヒド官能基化多孔性ガラス分子トラップ（アルデヒド・マイクロカラム）を調製し、位置1に装填する。次に、グルタルアルデヒド・マイクロカラム上の活性化されたアルデヒド基を、自動装置ステージの位置2に装填したポリリジン（30～300kDa）（110μL、HBS中1mg/mL）と共にインキュベートすると、1つの重合骨格が形成され、そこから新たにグルタルアルデヒドに媒介された活性化が行われ、増幅マイクロトップ表面

10

20

30

40

50

に抗体が結合する。

【0094】

この最初のカップリング工程に続いて、ステーション3での徹底的なリンス、HBS緩衝液の50回反復吸引を行うと、急速な自動装置媒介活性化カップリングが生じる（反応時間30分）。ステーション4での最終の水リンス（約50回反復吸引）後、グルタルアルデヒド・マトリックス上の活性化アルデヒド基を、ステーション5（0.1～1mg/mL、55μL/ウェル、200回反復吸引）で興味あるタンパク質抗体と共にインキュベートすると、MASSAYマイクロカラムはアフィニティー・ピペットとなる。カップリングしなかった（過剰）抗体は、ステーション6でHBS緩衝液（10mM HEPES pH7.4、0.15M NaCl、0.005%界面活性剤P20）で完全にリンスして除去する。

10

【実施例22】

【0095】

MALDI-TOF用の化学的にマスクされたターゲットとマイクロカラム溶出の準備配列されたターゲットは、溶出条件下でマイクロカラムから送られる分析対象物サンプルを局在化する働きをする親水性ターゲットを提供する。これらの溶出条件は、分析の目的によって変わり、一般的に使用されるMALDI-TOFマトリックス（アセトニトリル：0.2% TFA水溶液が約1：2の比率の溶液中におけるアルファシアノー4-ヒドロキシ桂皮酸）、希釈酸、希釈塩基、カオトロピック剤などに亘る。

20

【0096】

本実施例では、ターゲット表面は、興味のあるアッセイに用いられる生体材料の種類に応じて、目的の分析用に調製された化学的マスク内で、親水性ターゲットが疎水性バックグラウンドと協調して働くコントラストのある配列から成り立っている。目的にかかわらず、第1に必要なことは、リンスとインキュベーションの一連の表面洗浄である。最初にターゲット表面を界面活性剤で洗浄し、水リンスし、メタノールリンスし、次に、10～15%過酸化水素水溶液中、室温（または昇温）で30分から1時間インキュベートする。その後、洗浄表面を水リンス、メタノールリンスし、窒素乾燥し、ターゲット領域に興味あるアルキルメルカプタンによって誘導化する。陽イオン交換表面には、有機溶媒（イソプロパノールなど）中の飽和溶液として、11-メルカプトウンデカン酸または3-メルカプト-1-プロパンスルホン酸が用いられる。この表面を直ちにオクタデシルメルカプタンの飽和溶液で被覆するか、またはイソプロパノール、続いてメタノールでリンスし、引き続きオクタデシルメルカプタンの飽和溶液で被覆する。化学的にコントラストを付けられた、すなわちマスク化された表面は、マイクロカラム分析対象物の局在化および質量分析によるサンプル分析用となる。これらの陽イオン交換表面は、一般的な生物学的材料での操作用に設計され、特に尿由来材料のアッセイの際に有用である。また、マスク化ターゲットは、正に荷電した官能基を用いて作製され、陰イオン交換体として使用されることもある。

30

【実施例23】

【0097】

生体サンプルのハイ・スループット統合システムMALDI-TOF分析

40

本実施例では、ハイ・スループット統合システムの能力を示しながら新しい（nascent）生体液由来生体関連生体分子の並列処理と分析の統合システムを例示する。図8に示したのは、本発明の統合化されたシステムと方法を用いて行われる、ヒト血漿サンプル由来のベクター2-ミクログロブリン（β₂m）のハイ・スループット半定量的分析である。6人から採取された希釈（5倍）ヒト血漿サンプルの一定分量を96ウェルのサンプルプレート上に並行スクリーニング用に調製した。各ウェルに15μLの血漿一定分量（6人のサンプルは、96ウェルプレート上に無作為化された）、7.5μLのウマ血漿（未希釈、ウマβ₂mを含み、MW_{β₂m} = 11396.6, MW_{human β₂m} = 11729.2）および128μLのHBS（0.01HEPES、pH7.4、0.15M NaCl、0.005%（v/v）ポリソルビン酸塩20、3mM EDTA）緩

50

衝液を入れた。96個のサンプルから8個を任意に選び、その内の4個のウェルに $\beta_2 m$ の 10^{-2} mg/mL 溶液 $0.5 \mu\text{L}$ を加え、他の4個のウェルには、同じ $\beta_2 m$ 溶液 $1 \mu\text{L}$ を加えた。並列サンプル処理は、96本の抗 $\beta_2 m$ 誘導化マイクロカラム上、96個のサンプルの同時インキュベーション／捕捉を伴う。アミノ被覆／修飾マイクロカラムに対するカルボキシメチルデキストラン (CMD) - EDCに媒介された抗体のカップリングにより、ポリクロナル抗 $\beta_2 m$ マイクロカラムが作製された。捕捉されたタンパク質は、少量のMALDIマトリックス (33% (v/v) アセトニトリル、0.2% (v/v) トリフルオロ酢酸中の α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸 (ACCA) 飽和溶液) により、マイクロカラムから溶出し、化学的にマスクされた自己組織化単分子膜 (SAM) から構成されるMALDIターゲット・アレイ表面にスタンプされ、親水性／疎水性コントラストを有するターゲット・アレイとなる。ターゲット・アレイ上の各サンプルスポットは、質量分析を用いて分析され、相対的 $\beta_2 m$ 量は、自動MALDI-TOF質量分析ソフトウェアルーチンにより決定される。96個のサンプルの高効率分析から得られた質量スペクトルを図8に示す。 $\beta_2 m$ 標準溶液を加えたサンプルからとられたスペクトルは黒塗りしてある。

10

【0098】

図9の棒グラフによる表示で、図8で示されたハイ・スループットシステムにより生成された半定量データを説明する。図8で示された各スペクトルを、ベースライン積分により、ウマ $\beta_2 m$ シグナルへと標準化し、ヒト $\beta_2 m$ シグナルに関する標準化積分を決定した。同一個体のサンプルから得られたスペクトルの全 $\beta_2 m$ 積分値を平均化し、標準偏差を計算した。同様に、 10^{-2} mg/mL の $\beta_2 m$ 溶液を $0.5 \mu\text{L}$ および $1.0 \mu\text{L}$ を加えたサンプルに関する積分値を計算し、平均化した。この図に描かれたものは、6人の個人サンプル、および該溶液を加えたサンプルに関する標準化ヒト $\beta_2 m$ 積分の平均値である。この棒グラフは、該溶液を加えたサンプルにおける $\beta_2 m$ 濃度の増加を明らかに示しており、ヒト血液における $\beta_2 m$ 濃度の増加が種々の病態に関連していることを事実として確認した点で、本発明に記載されたシステムと方法を用いて実施されるハイ・スループット半定量的分析の価値を示している。

20

【0099】

本発明内に述べられた統合システムおよび方法は、他に図10のヒト血液の $\beta_2 m$ ハイ・スループット定量分析に示されている。6人の血漿サンプルが、図8に記載されたとおり調製された。96ウェルサンプルプレートのうち、88個のウェルに $15 \mu\text{L}$ の血漿一定分量 (6人のサンプルは、96ウェルプレート上に無作為化された)。7.5 μL のウマ血漿 (未希釈) および128 μL のHBS緩衝液を入れた。精製ヒト $\beta_2 m$ の $7.6 \times 10^{-4} \text{ mg/mL}$ 標準溶液の一連の希釈物を調製し (濃度は $7.7 \times 10^{-4} \text{ mg/mL}$ から $1.14 \times 10^{-4} \text{ mg/mL}$ に亘る)、96ウェルプレート上での最後の列 (8ウェル) におけるサンプル (各 $15 \mu\text{L}$) として用いた。並列サンプリング処理およびMALDI-TOFMS分析は、ポリクロナル抗 $\beta_2 m$ マイクロカラムを用いて図8に記載されているとおり行った。88個のサンプルおよび8個の標品のハイ・スループット分析から得られた質量スペクトルを図10に示す。標準サンプルから得られたスペクトルは黒塗りしてある。

30

40

【0100】

図11bは、図10に示された標準サンプルに関する図11aのデータから作図された検量線である。この検量線は、本発明で記載された統合システムおよび方法を用いたハイ・スループット分析によりスクリーニングされたヒト血漿サンプルにおける $\beta_2 m$ 濃度を決定するために作製されている。検量線を作成するために用いられる各標品に関するデータの代表的なスペクトルを図11aに重ねて表している。各スペクトルを、ベースライン積分により、ウマ $\beta_2 m$ シグナルへと標準化し、ヒト $\beta_2 m$ シグナルに関する標準化積分値を決定した。各検量標準に関してとられた5本のスペクトルの積分値が平均化され、標準偏差が計算された。検量 (標準) 線は、標準サンプル (ヒト血漿の希釈率によって調整されている) におけるヒト $\beta_2 m$ 濃度に対する、各標準の標準化積分値の平均をプロットす

50

ることにより作図した。作成された検量線を図11bに示す。濃度範囲は、線全体において標準偏差 $<2\%$ で良好な直線性 ($R^2 = 0.999$) を有して広がっている。

【0101】

図12は、図11bで作図された標準曲線を用いて、図10で示されたデータを棒線解析したもの示す。図10の88個のサンプルに関し、各スペクルをベースライン積分によりウマ β_2 mシグナルへと標準化し、ヒト β_2 mシグナルに関する標準化積分を決定した。同一個体に関するヒト β_2 m積分を平均化し、標準偏差を計算した。平均積分値を標準曲線から導いた等式で変換し、各個体に関してヒト β_2 m濃度を計算した。決定された濃度範囲は 0.75 mg/mL から 1.25 mg/mL であった。

【実施例24】

【0102】

点突然変異に関するハイ・スループット・アフィニティ回収と生体反応性アレイMALDI-TOF分析とを組み入れた統合システム法

図13は、翻訳後修飾 (PTM) に関するトランスチレチン (TTR) の定量的ハイ・スループット・スクリーニングであり、ここで記載されている統合システムと方法とを用いて点突然変異 (PM) を実施した。6人から採取した希釈 (5倍) ヒト血漿サンプルの一定分量を並行スクリーニングのために96ウェルプレートに調製した。各ウェルに $15\mu\text{L}$ の血漿分量 (6人のサンプルは、96ウェルプレート上に無作為化された)、および $135\mu\text{L}$ のHBS緩衝液を入れた。並列サンプル処理は、96本の抗TTR誘導化マイクロカラム上、96個のサンプルの同時インキュベーション/捕捉を伴う。アミノ被覆/修飾マイクロカラムに対するグルタルアルデヒドに媒介された抗体のカップリングにより、ポリクロナル抗 β_2 mマイクロカラムが作製された。捕捉されたタンパク質は少量のMALDIマトリックス (飽和ACCA溶液) により、マイクロカラムから溶出し、親水性/疎水性コントラスト・ターゲットとなるよう化学的にマスクされた自己組織化単分子膜 (SAM) から構成されるMALDIターゲット・アレイ表面にスタンプされる。ターゲット・アレイ上の各サンプルスポットは、質量分析を用いて分析され、相対的TTR量は、自動MALDI-TOF質量分析ソフトウェアルーチンにより決定される。96個のサンプルのハイ・スループット分析から得られた質量スペクトルを図13に示す。スペクトルの全てにおいて、TTRシグナルは、翻訳後プロセスを受けたTTRを示す、より質量の大きいもう一つのシグナルを伴っている。また、ある血漿サンプルの分析から得られたスペクトル全ては、2本の「オリジナル」のTTRシグナルから、約 30 Da 高い位置に、さらに2本のシグナルを示した。これらのピークの同定に関しては図15および図16を参照のこと。

【0103】

図14は、ハイ・スループットTTR分析で観測された翻訳後修飾と点突然変異を、ここに記載されている統合システムと方法とを用いて同定したものである。2人のサンプル分析から得られた代表的スペクトルを示したが、それぞれ2本および4本のシグナルの存在が示されている。上のスペクトルでは、TTRに帰属する2本のシグナルが認められる。シグナルは、TTRの理論的に計算された質量 ($MW_{TTR} = 13,762$) およびCys10でのシステイン化 ($+119\text{ Da}$ の質量シフトを導く) から生じる酸化TTR変異体 (TTR_x) のそれによく対応している。下のスペクトルでは、上述した2本のTTRシグナルに加えて、この2本の「原」TTRシグナルより約 30 Da 高い質量に、さらに2本のピークが見られる。これら2本のピークの同定に関しては図15および図16を参照のこと。

【0104】

引き続き行われたTTR点突然変異の分析は、図15に示すように、本発明に記載されたシステムプラットフォームと方法における、誘導体化質量分析計ターゲット・アレイとハイ・スループットのアフィニティ回収との組合せを用いて明らかにされる。用いられたサンプルは、図14で使用されたものと同じである。希釈した (HBS中50倍) ヒト血漿のTTRは、図13に記載されたとおり、ポリクロナル抗TTRマイクロカラムによ

10

20

30

40

50

り捕捉された。捕捉タンパク質は、マトリックス溶出の代わりに、サンプルのpH調整（緩衝液交換）のための緩衝液含有ターゲットスポット（50 mM TRIS緩衝液、pH 9.5）を含むトリプシン結合ターゲット上に、少量の10 mM HClで溶出した。この図に示されているのは、抗TTRマイクロカラムから溶出したタンパク質を40℃でトリプシンにより20分消化したものから得られた質量スペクトルである。得られた2枚のトリプシン消化によるペプチド・マップは、104～127残基を含むトリプシン・フラグメント-12（T₁₂）に変異があることを突き止めている。データベース検索により、この領域の配列における2つの可能なTTR変異が挙げられる：Ala109→Thr [DNAの塩基変化はGCC→ACC]、 $\Delta m = 30.011$ Da, Thr119→Met [DNAの塩基変化はACG→ATG]、 $\Delta m = 29.992$ Da。正しい変異の同定を図16に示す。

10

【0105】

図16は、図15に示された血漿サンプル分析で検出された点突然変異の正体を決定するために用いられた高分解能リフレクトロン型質量分析法であり、本発明に記載された統合システムおよび方法に組み込まれている。標準（天然）TTRにおけるトリプシン消化フラグメントT₁₂（104～127）のモノアイソトピック・シグナルは、 $m/z = 2644.922$ であり、変異TTRのモノアイソトピック・シグナルと、 $\Delta m = 29.988$ Daの差を示す。したがって、点突然変異は、Thr119→Met、 $\Delta m = 29.992$ Daに帰着する。このTTR点突然変異は、いわゆる非アミロイド変異である「シカゴブレアルブミン」変異となる。図13、図14、図15、図16に合わせて示された結果は、生体サンプルの協奏的ハイ・スループット・スクリーニング分析による翻訳後修飾および点突然変異の同定に関する、本明細書に記載されたシステムと方法の使用を説明している。

20

【実施例25】

【0106】

翻訳後修飾（PTM）の解析のための、ハイ・スループット・アフィニティ回収と生体反応性アレイMALDI-TOFとを組み入れた統合組合せ法

図17aは、本明細書に記載された統合システムと方法とを用いて実施された、生体液に存在する翻訳後修飾に関する定量的ハイ・スループット・スクリーニングの代表例である。協奏的な生体液リン酸塩分析が、アルカリホスファターゼ（AP）官能基化ターゲット・アレイと共にキレート・アフィニティー・ピペットを用いて実施された。ここでキレート・アフィニティー・ピペットは、実施例14に従って以前開示されたとおり調製した。遠心分離し、10倍に希釈したヒト全唾液をサンプル内で金属キレート・アフィニティー・ピペットによるインキュベーション後に分析した。金属キレート・アフィニティー・ピペットから捕捉された分析対象物は、キレート/金属/分析対象物の相互作用を攪乱させるため希釈酸の添加により溶出して親水性/疎水性コントラスト・ターゲット・アレイ、またはアルカリホスファターゼ消化のために緩衝液交換を組み込んだ。希釈ヒト唾液の直接分析では、プロリンに富む興味あるタンパク質に著しく欠ける。図17b（2）のスペクトルは、2つのリン酸塩に富むタンパク質、PRP-1およびPRP-3として示された金属キレート・アフィニティー・ピペットの捕捉を示している。脱リン酸化の質量シグナルとして、図17b（3）で小さなスペクトルが見られ、図17b（4）では完全な形で見られる。リン酸化現象などの翻訳後分析のために生体液から捕捉/消化されたリンタンパク質の部分的および完全リン酸化を伴う複数分析対象物の検出が示されている。

30

40

【実施例26】

【0107】

新しい（nascent）タンパク質複合体の回収に必要なアフィニティー複数タンパク質相互作用に関するMALDI-TOF分析による統合システム法

本実施例では、生体材料または生体サンプル中に存在する天然の複数タンパク質複合体の回収を可能にするタンパク質間相互作用が示される。図18で示されるのは、本発明の統合システムと方法を用いて実施されたヒト血漿サンプルのレチノール結合タンパク質（R

50

B P) とトランスチレチン (trans-thyretin) (T T R) との間の複数タンパク質複合体である。グルタルアルデヒド仲介性のアミン塩基支持表面カップリングを用いてポリクローナル抗 R B P アフィニティー・ピペットが形成された。上記実施例で記載したとおり、ヒト血漿が調製され、使用された。M S I A は、R B P および複合 T T R の in vivo アフィニティー回収を示している。レチノール結合タンパク質 (R B P) とトランスチレチン (trans-thyretin) (T T R) との間の複数タンパク質複合体は、天然のタンパク質複合体の中にタンパク質相互作用が存在することを示している。

【実施例 27】

【0108】

ハイ・スループット複数分析対象物回収と M A L D I - T O F 分析とを組み入れた統合システム法

本実施例では、本発明に係る統合システムと方法を用いた迅速な定性化と半定量のために実施されたヒト血漿サンプルの複数分析対象物分析を例示するために、複数レセプター・アフィニティー・マイクロカラムによるハイ・スループット法を記載する。図 19 に、相対量の複数分析対象物の同時迅速モニタリングを示す。ヒト血漿からそれぞれの分析対象物を迅速に捕捉するために、アミン活性化ポリクローナル抗 β_2 m / C y s C / T T R アフィニティー・ピペットを、前述のとおり使用した。次にこれは、生体液濃度調整を迅速にモニターするため、また、それらの標準化相対量からの調整化されたタンパク質事象を定量化するための、 β_2 m、C y s C および T T R に対する複数抗体アフィニティー・ピペットの使用例を例示している。さらに、ウィルス感染の急性期または β_2 m または T T R からのフィブリル形成における潜在的 β_2 m / C y s C 濃度のモニタリングに関する本発明の統合システムと方法におけるアフィニティー・ピペットの使用法を例示している。

【0109】

図 20 には、本発明の統合システムと方法における完全な複数分析対象物アフィニティー・ピペットの迅速モニタリングを示す。ヒト血漿（前例で述べたとおりに得）からのそれぞれの分析対象物を捕捉するために、 β_2 m、T T R、R B P、シスタチン C または C R P を組み入れた個々のポリクローナル抗体アフィニティー・ピペットと同様にその組合せもまた用いられた。生体液濃度調整を、迅速にモニターするため、また、場合によってはそれらの標準化相対量からの調整タンパク質事象を定量化するために、 β_2 m、C y s C および T T R または C R P に対する複数／単一抗体アフィニティー・ピペットのもう 1 つの使用法を例示している。さらに、ウィルス感染（エイズなど）の急性期または β_2 m または T T R からのフィブリル形成における潜在的 β_2 m / C y s C 濃度のモニタリングに関するアフィニティー・ピペットのもう 1 つの使用法を例示している。

【0110】

サンプルを効率的に増加できる能力が与えられると、生体分子の質量分析に関するハイ・スループットシステムの統合化で、大規模な臨床的、診断的、治療的有効性において、また、生体液からの生物学的に重要な生体分子分析での、例外的な定性分析および定量分析の双方が必要である応用における使用が増える。

【0111】

本明細書で用いられる「アフィニティー・マイクロカラム」とは、ハウジング内に含まれる分子トラップを指す。

【0112】

ここで用いられる「アフィニティー試薬」とは、分子トラップの表面にあり、化学的に活性化されているか、または活性化可能であって、親和性レセプターが共有結合し得る化学分子種を指す。

【0113】

本明細書で用いられる「親和性レセプター」とは、生体材料または生体サンプル中に存在している分析対象物に対し親和性を有する原子種または分子種を指す。親和性レセプターは、天然の有機物、無機物または生体物質であってよく、また広汎な（多数の分析対象物

10

20

30

40

50

が標的) 特異性から狭い (単一分析対象物が標的) 特異性を示し得る。親和性レセプターの例としては、抗体、抗体フラグメント、パラトープ、ペプチド、ポリペプチド、酵素、タンパク質、複数サブユニットタンパク質レセプター、ミミック (m i m i c)、有機分子、ポリマー、無機分子、キレータ、核酸、アプタマー、および後述のレセプターなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【0114】

本明細書で用いられる「分析対象物」とは、生体サンプル中に存在する興味ある分子を指す。分析対象物としては、核酸 (DNA、RNA)、ペプチド、ホルモン性ペプチド、ホルモン、ポリペプチド、タンパク質、タンパク質複合体、生物学的機能を有する炭水化物または無機低分子または有機低分子などが挙げられるが、これらに限定されない。分析対象物は、当然親和性レセプターにより認識される配列、要素または基を含み得るか、または細胞の、細胞外の、酵素的、化学的处理により、それらの中に導入されたこれらの認識部分を有し得る。

【0115】

本明細書で用いられる「生体材料」または「生体サンプル」とは、生体起源の液体または抽出物を指す。生体材料は、限定されないが、細胞抽出物、核抽出物、細胞ライゼート、分泌物、血液、血清、血漿、尿、たん、滑液、脳脊髄液、涙液、糞便、唾液、膜抽出物などであり得る。

【0116】

本明細書で用いられる「化学的活性化」とは、引続く鎖状化リンカーや親和性レセプターを攻撃 (光活性化) するために、アフィニティー試薬を化学物質 (または光) に曝露する処理を指す。アフィニティー試薬を活性化できる試薬は、限定されないが、有機試薬、無機試薬、または生物学的試薬であり得る。鎖状化リンカーの使用を含む複数の工程を用いて、アフィニティー試薬を活性化することがしばしば有益である。ここで用いられる「鎖状化リンカー」とは、高濃度の親和性レセプターで誘導体化することができ、非特異的化合物とは結合性が低いという望ましい特徴を示すアフィニティー試薬および親和性レセプターとの仲介をする化合物を指す。鎖状化リンカーは、本来活性であり得るか、または付加のために活性化を要してもよい。好適な鎖状化試薬としては、限定はしないが、ホモヘテロ機能有機物、天然ポリマー、合成ポリマー、および生体ポリマーが挙げられる。

【0117】

本明細書で用いられる「デッドボリューム」とは、分子トラップ内の空の容積を指す。ここで用いられる「少デッドボリューム」とは、1 ナノリットルから1 ミリリットルの範囲を指す。

【0118】

本明細書で用いられる「高流動性」とは、最低でも1 分間に1 マイクロリットルの流速を指す。それより高い流速が、高流動性の定義の中に入ると考えられる。

【0119】

本明細書で用いられる「質量分析計」とは、分析対象物を揮発/イオン化して気相イオンを形成し、それらの絶対的または相対的分子量を測定することのできるデバイスを指す。揮発化/イオン化の好適な形態は、レーザー/光、熱、電気、噴霧/スプレーなど、またはそれらの組合せである。質量分析の好適な形態は、限定はされないが、MALDI-TOF MS、エレクトロスプレー (またはナノスプレー) ・イオン化 (ESI) 質量分析、四重極イオントラップ、フーリエ変換イオンサイクロトロン (FT-ICR)、磁気セクターなど、またはそれらを組み合わせた質量分析計が挙げられる。

【0120】

本明細書で用いられる「質量分析計のターゲット」または「質量分析計のターゲット・アレイ」とは、その上、またはその中に、連続的質量分析のために、1 個以上の分析対象物が置かれる装置を指す。一般にターゲットは、質量分析計の性質によって多くのサンプルに適応し、種々の幾何学的配置をとるが、その質量分析計用にターゲットが選択される。ターゲットを構築するために好適な物質としては、金属、ガラス、プラスチック、ポリ

10

20

30

40

50

マー、多層体など、またはそれらの組合せが挙げられる。

【0121】

本明細書で用いられる「分子トラップ」とは、表面に結合したアフィニティー試薬を中に含み、高流動性および少デッドボリュームを有する広表面積物質を指す。広表面積物質の組合せは、限定しないが、結晶、ガラス、プラスチック、ポリマー、金属、またはこれらの物質の何れかの組合せであり得る。例えば、これらのガラスは、石英ガラス、ホウケイ酸、ホウケイ酸ナトリウム、および他の有用な物質であり得る。

【0122】

本明細書で用いられる用語「レセプター」とは、一般に特異的に認識し、互いに結合する1対の化合物のうちの一員を指す。対の他方の一員は「リガンド」と呼ばれ、錯体、タンパク質-タンパク質層相互作用、複数分析対象物分析などのようなものを含む。レセプター/リガンド対形成としては、タンパク質レセプター、(膜性)およびその天然リガンド(関連した、または他のタンパク質または低分子)を挙げることができる。レセプター/リガンド対としては、また、抗体/抗原結合対、相補的核酸、核酸関連タンパク質およびアプタマーやそれらのタンパク質などのそれらの核酸リガンド、金属キレートおよび金属結合タンパク質リガンド、擬染料およびそれらのタンパク質リガンド、有機分子およびそれらの相互作用、生体分子状の、または生体分子を有する疎水性パッチのようなもの、生体分子上の、または生体分子を有するイオン交換体およびそれらの静電相互作用などを挙げられる。

【0123】

本明細書で用いられる「自動装置」とは、サンプルの非参加処理の可能なデバイスおよび方法を指す。自動装置は、与えられた時間内に処理、分析するサンプルの数を最大化するために、多数のサンプルを並行して操作することが好ましい。

【0124】

本発明の好適な実施態様は、図面と好適な実施態様の説明において説明してある。これらの記載は、直接上の実施態様を説明しているが、当業者は、ここに示された特定の実施態様に対する変更および/または変形を考慮することができると解される。本記載の範囲に入るそのような修飾または変更はいずれも同様にそこに含まれることが意図される。特に注記しない限り、明細書および特許請求の範囲における語句は、その適用業界における通常の当業者に対して、通常の慣用的意味が与えられることが発明者の意図である。出願時に出版者に知られている発明の好適な実施態様および最善の形態は提示されており、例示と記述の目的が意図されている。徹底性や、本発明を開示されたそのままの形に限定する意図はなく、上記の教示に照らして、多くの修飾や変更が可能である。実施態様は本発明の原理や実用的な応用を最もよく説明し、他の当業者によって考えられる特別な使用法に適合するように種々の実施態様において、また種々の修飾によって本発明を最も良く利用できるように選択し、説明した。

【図面の簡単な説明】

【0125】

【図1】MSIA法を示す図である。分析対象物は、レセプター誘導体化アフィニティー・ピペットを通して反復フローを行うことにより溶液から選択的に回収される。非特異的に結合した化合物を洗浄した後、保持された分子種は、(好適な実施態様においては)MALDIマトリックスを用いて質量分析計ターゲットまたはターゲット・アレイ上に溶出される。次にMALDI-TOF MSにより、分析対象物の正確な m/z 値を検出する。分析は、本来定性的であるが、分析対象物の質量シフト変異体を内部基準として使用する手法に組み入れることにより定量もできる。

【図2】生体液の β_2 -ミクログロブリンのMSIAスクリーニングを示す図である。サンプルは、生体液をHBS(単独のMALDI-TOF用の H_2O)で希釈することにより調製した。アフィニティー・ピペットをHBSと水を用いて洗浄してから、ACCA($ACN:H_2O$ 、1:2に飽和; 0.2% TFA)を用いて質量分析計のターゲット上に直接保持された化合物を溶出する。(A) ヒト涙液。(B) ヒト血漿。(C) ヒト唾液-

10

20

30

40

50

唾液は、非特異的結合を減じるために、0.05% SDS (水中) で追加のリンスを必要とした。(D) ヒト尿。全ての場合に、 β_2 mを、フロー・インキュベート/リンス手法を用いて生体液から効率的に回収した。 β_2 mに関して測定された(外部較正を用いて)質量は、計算値($MW_{calc} = 11,729.7$; $MW_{theor} = 11,735$; $MW_{plasma} = 11,734$; $MW_{saliva} = 11,742$; $MW_{urine} = 11,735$)の約0.1%以内であった。方向づけされた、迅速、鋭敏で正確な分析のためのMSIAによる種々の生体液スクリーニングを例証した。

【図3a】 β_2 mの定量的MSIA検量線を示す図である。検量線を作成するために用いられたデータの代表的なスペクトル。0.01~1.0 mg/Lの濃度のヒト β_2 mについて調べた。ウマの β_2 m($MW = 11,396.6$)を内部基準として用いた。

10

【図3b】図3aに表されるデータを用いて作成された検量線を示す図である。2~10の範囲に亘って、良好な直線性($R^2 = 0.983$)を低い標準誤差(~5%)で得られた。エラーバーは、各サンプルからとられた10回反復の65-レーザーショットスペクトルの標準偏差を反映する。これらの図は、 β_2 m-アフィニティー・ピペットにより実施された定量的MSIAを例証する。

【図4】 β_2 mの定量的MSIAスクリーニングを示す図である。5人からのヒト尿サンプルを2日間かけてスクリーニングを行った。健康人(10サンプル; 4人(3人の男性; 1人の女性)年齢30~44才)で測定された平均値は、 0.100 ± 0.021 mg/Lであった。最近尿路感染した86才の女性で測定された濃度について、 β_2 m濃度が有意に増加したことを示した(3.23 ± 0.072 mg/L)。

20

【図5】86才の女性においてグリコシル化 β_2 mの濃度増加を示すMSIAの図(暗灰色)である。MSIA中、第2のシグナルは、 $\Delta m = +161$ Daに観測され、グリコシル化 β_2 mの存在を示した。MSIAは、2種の β_2 m体を十分に分解でき、発生期(nascent) β_2 mのより正確な定量を得て糖タンパク質の定量を可能にした。このような識別化は、2種の β_2 m体が、異なる疾病から由来する(またはマーカーである)ことを考慮する上で重要である。グリコシル化を殆ど示さない健康人のMSIAを、比較のために示している(明灰色)。

【図6】定義された生体液/ β_2 -ミクログロブリン特異性に関して表面利用型のMSIAを示す図である。カルボキシメチルデキストラン増幅により結合されたポリクローナル抗 β_2 mアフィニティー・ピペットの使用、またはアミン塩基支持化学は、生体液/MSIA中の非特異的結合化合物と特異的結合化合物との識別化を可能にする。サンプルは、生体液から調製され、図2に示すとおり使用した。(A) ヒト血漿。(B) CMD増幅 β_2 mアフィニティー・ピペットを通したヒト血漿。(C) アミン/グルタルアルデヒド結合 β_2 mアフィニティー・ピペットを通したヒト血漿。ヒト血漿スペクトルの直接的分析(上段スペクトル)は、 β_2 m質量信号($MW_{plasma} = 11,734$)を欠く。CMDは、アフィニティー・ピペット化学標的 β_2 mを増幅したが、非特異的結合化合物を示す(中段スペクトル)。最後の場合のみ、 β_2 mは、低濃度の非特異的結合化合物を有する生体液から効率的に回収される(下段スペクトル)。これは、特定の質量検出のため注意深くアフィニティー・ピペットを用いて血液由来の生体液バイオマーカーの指向分析における好適な面を例証している。

30

40

【図7a】生体材料から生体分子のハイ・スループット分析のため統合システムを説明する模式図である。

【図7b】使用されるステーションを示す拡大模式図であり、これは、化学修飾、マイクロカラムの官能基化、生体液分析、移動などのための複数の配置を有するマイクロカラム統合自動装置から構成される。

【図8】 β_2 m MSIAのハイ・スループット半定量分析を示す図である。ヒト血漿サンプルからの β_2 mは、本発明に記載された統合システムおよび方法を用いた。

【図9】図8に示されたデータの棒グラフ解析を示すグラフである。図8に示された各スペクトルは、ベースラインの積算によりウマの β_2 mシグナルに標準化し、ヒト β_2 mシグナルの標準化積分を測定した。同じ個体のサンプルから得られたスペクトルの全 β_2 m

50

積分を平均化し、標準偏差を計算した。同じく、 $10^{-2} \text{ mg/mL } \beta_2 \text{ m}$ の $0.5 \mu\text{L}$ および $1.0 \mu\text{L}$ でスパイクされたサンプルの積算を計算し、平均化した。6人からのサンプルおよびスパイクされたサンプルの基準化ヒト $\beta_2 \text{ m}$ 積算の平均値を、この図にプロットしている。この棒グラフは、スパイクサンプルにおける $\beta_2 \text{ m}$ 濃度の上昇が明瞭に確証しており、種々の疾患状態に関連するヒト血液中の $\beta_2 \text{ m}$ 濃度上昇の確証において、本発明に記載されたシステムと方法により実施されたハイ・スループット半定量分析の値を例証している。

【図10】本発明に記載された統合システムおよび方法を用いたヒト血漿サンプルからの $\beta_2 \text{ m}$ のハイ・スループット定量分析を示す図である。

【図11a】本発明に記載された統合システムおよび方法を用いてハイ・スループット分析によりスクリーンされたヒト血漿サンプル中の $\beta_2 \text{ m}$ 濃度を決定する目的で、図10に示された標準サンプルのデータから検量線の作図を示す図である。

10

【図11b】本発明に記載された統合システムおよび方法を用いてハイ・スループット分析によりスクリーンされたヒト血漿サンプル中の $\beta_2 \text{ m}$ 濃度を決定する目的で、図10に示された標準サンプルのデータから検量線の作図を示す図である。

【図12】上記で作図された検量線を用いて上記に示されたデータの棒グラフ解析を示すグラフである。図10における88個のサンプルスペクトルの各々を、ベースライン積算によりウマの $\beta_2 \text{ m}$ シグナルに標準化し、ヒト $\beta_2 \text{ m}$ シグナルの標準化積分を測定した。同じ個体のヒト $\beta_2 \text{ m}$ 積分を平均化し、標準偏差を計算した。平均化積分値を図11bの検量線から誘導された式中に置き換えて、ヒト $\beta_2 \text{ m}$ の濃度を、各人に対して計算した。決定された濃度範囲は、 0.75 mg/L から 1.25 mg/L である。

20

【図13】本発明に記載された統合システムと方法を用いて、翻訳後修飾 (PTM) および点突然変異 (PM) に関するトランスチレチン (trans thre tin) (TTR) の定量的ハイ・スループット・スクリーニングを示す図である。

【図14】本発明に記載された統合システムと方法を用いて、ハイ・スループット TTR 分析に観察される翻訳後修飾および点突然変異の同定を示す図である。

【図15】本発明に記載されたシステムと方法における誘導体質量分析計ターゲット・プラットフォームの組み入れによる点突然変異の同定を示す図である。

【図16】図15に示された血漿サンプルの分析で検出された点突然変異の同一性を決定するのに、本発明に記載された統合システムと方法の一部として高分解能レフレクトロン質量分析の使用を示す図である。

30

【図17a】生体液リン酸塩分析ーキレータ・アフィニティー・ピペットとアルカリフォスファターゼ官能基化ターゲット・アレイとの協奏を示す図である。(1) ヒト全唾液 (10倍希釈の $10 \mu\text{L}$)。 (2) EDTA/ Ca^{2+} アフィニティー・ピペットを通した (1) のサンプル。 (3) 10 mM HCl 添加により溶出し、 50 mM のホウ酸緩衝液と $\text{pH} = 10$ 緩衝液交換を組み入れた AP-BRP 上にスタンプし、15分間のリン酸塩で消化 (50°C) した (2) のサンプル。 (4) 30分間消化を延長した (3) のサンプル。ヒト唾液の10倍希釈の直接分析は、興味のあるプロリンに富むタンパク質-1 (PRP-1) とセリン修飾リン酸に富むタンパク質を著しく欠く。

【図17b】(2) のスペクトルは、2種のリン酸塩に富むタンパク質である、PRP-1 と PRP-3 の EDTA/ Ca^{2+} アフィニティー・ピペット捕捉を示す図である。脱リン酸化の質量信号は、微量スペクトルの (3) に、また完全スペクトルの (4) にはっきりと表われている。翻訳後分析 (すなわちリン酸化事象) のために生体液から捕捉され/消化されたリン酸化タンパク質の部分的並びに完全な脱リン酸化により伴う複数の分析物の検出を例示する。

40

【図18】レチノール結合タンパク質 (RBP) とトランスチレチン (TTR) との複数タンパク質複合体の MSIA を示す図である。活性アミン、ポリクロール抗 RBP アフィニティー・ピペットを、グルタルアルデヒド媒介アミン塩基支持表面カップリングにより形成した。ヒト血漿を調製し、図8の分析に用いた。MSIAは、RBP (MW = 21,062 Da) および複合体 TTR (MW = 13,760 Da) の in vivo・アフ

50

ィニティー回収を示す。天然タンパク質複合体に存在するタンパク質相互作用を例示する。

【図19】相対存在比に係る複数分析対象物を同時かつ迅速なモニタリングを示す図である。活性アミン、ポリクローナル抗 β_2 m/CysC/TTTRアフィニティー・ピペットを、ヒト血漿(HBS中50倍希釈)から迅速にそれぞれの分析対象物を捕捉するのに用いる。本図は、生体液濃度変調を迅速にモニターするため、また標準化相対存在比から変調タンパク質事象を定量するために β_2 m、CysCおよびTTTRに対し複数の抗体アフィニティー・ピペットの1使用例を示す。本図は、ウィルス感染(エイズなど)の急性期、或いは β_2 mまたはTTTRからのフィブリル形成における潜在的 β_2 m/CysC濃度をモニタリングするためのアフィニティー・ピペットの1使用例を示す。

10

【図20】広範囲の複数分析対象物のアフィニティー・ピペットの迅速なモニタリングを示す図である。個々の β_2 m、TTTR、RBP、シスタチンCまたはCRPを組み込んだポリクローナル抗体アフィニティー・ピペット/組合せは、ヒト血漿(HBS中50倍希釈)からのそれぞれの分析対象物を捕捉する。本図は、生体液濃度変調を迅速にモニターするため、また場合によっては標準化相対存在比から変調タンパク質事象を定量するために β_2 m、CysCおよびTTTRに対し複数/単独の抗体アフィニティー・ピペットの1使用例を示す。本図は、ウィルス感染(エイズなど)の急性期、或いは β_2 mまたはTTTRからのフィブリル形成における潜在的 β_2 m/CysC濃度をモニタリングするためのアフィニティー・ピペットの他の使用例を示す。

【図21】質量分析ターゲット・アレイを示す図である。(A)メニスカス作用によりサンプルを閉じ込めることのできる台状ターゲット。(B)疎水性/親水性作用によりサンプルを閉じ込めることのできる対照デザイン。(C)より小さなサンプリング充填、高価な試薬、またはサンプル移送に使用する挿入ターゲット。

20

【図1】

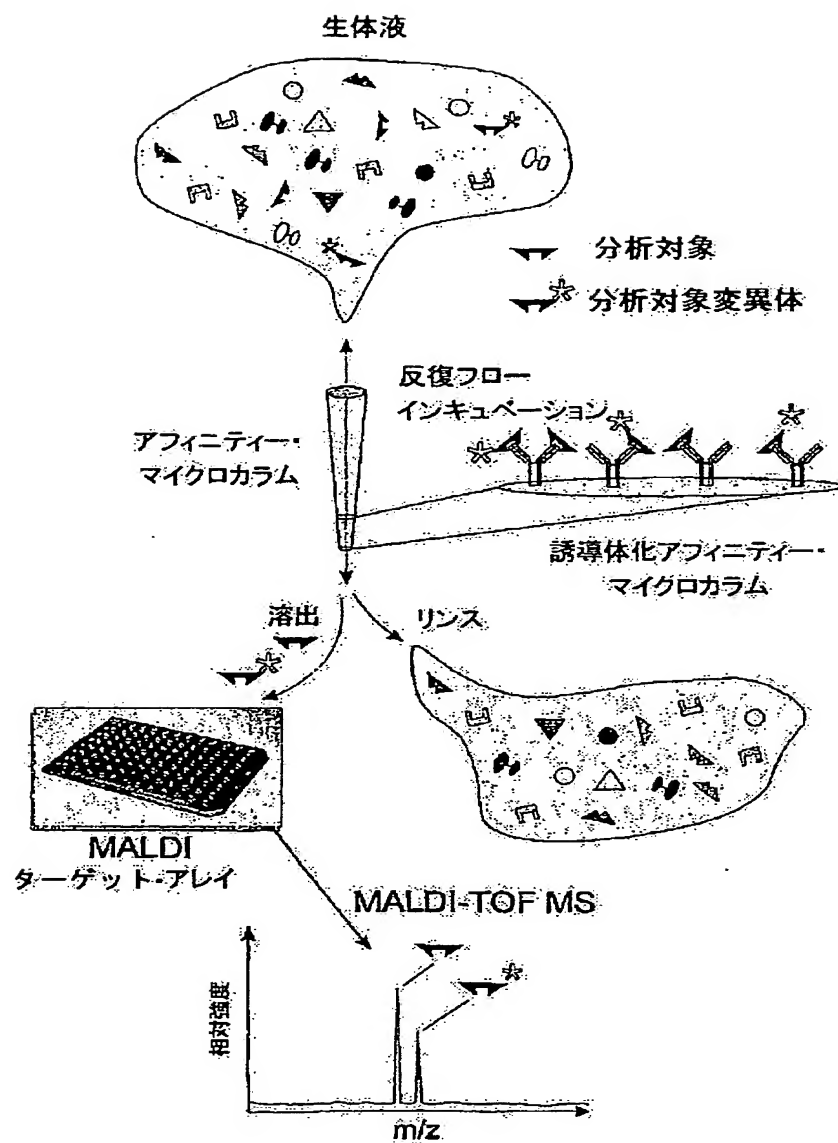


図 1

【図 2 a】

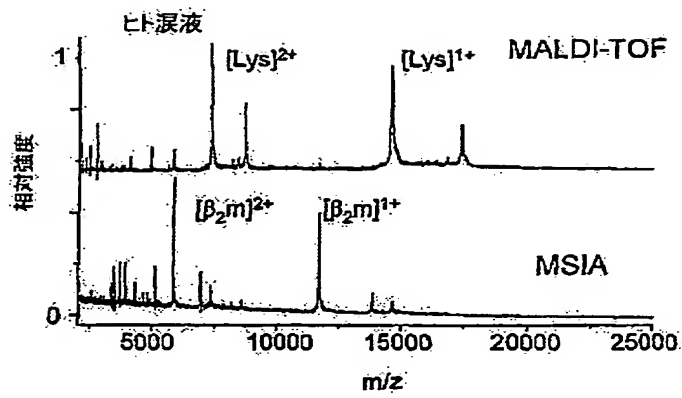


図2a

【図 2 b】

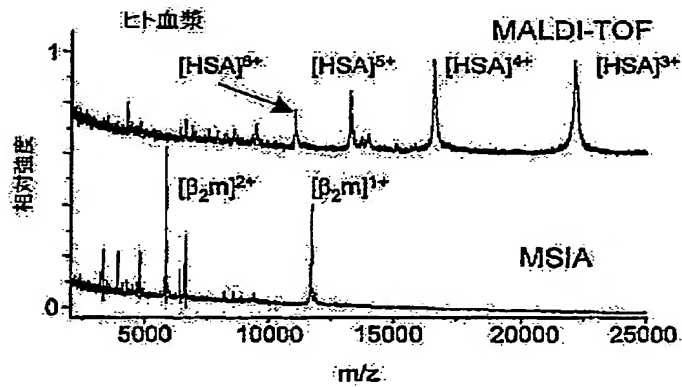


図2b

【図 2 c】

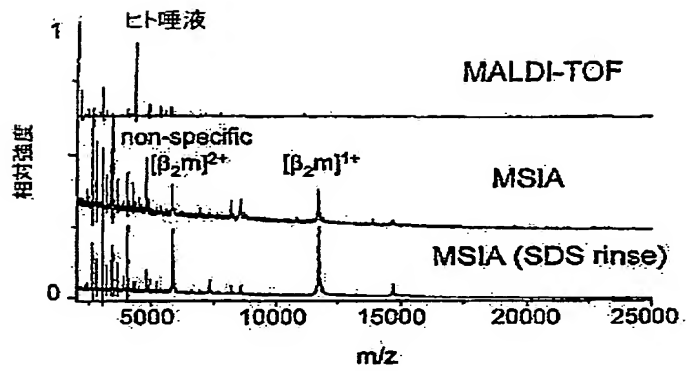


図2c

【図 2 d】

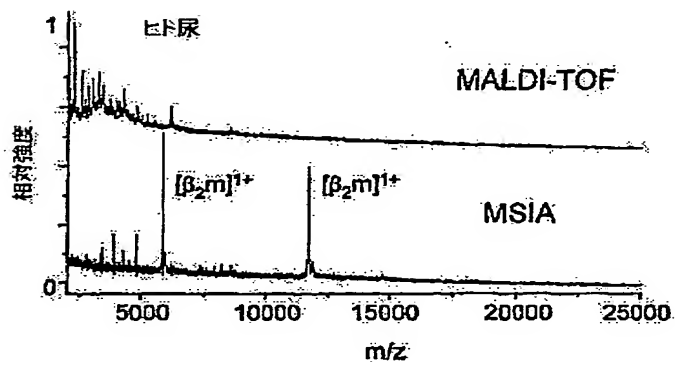


図2d

【図 3 a】

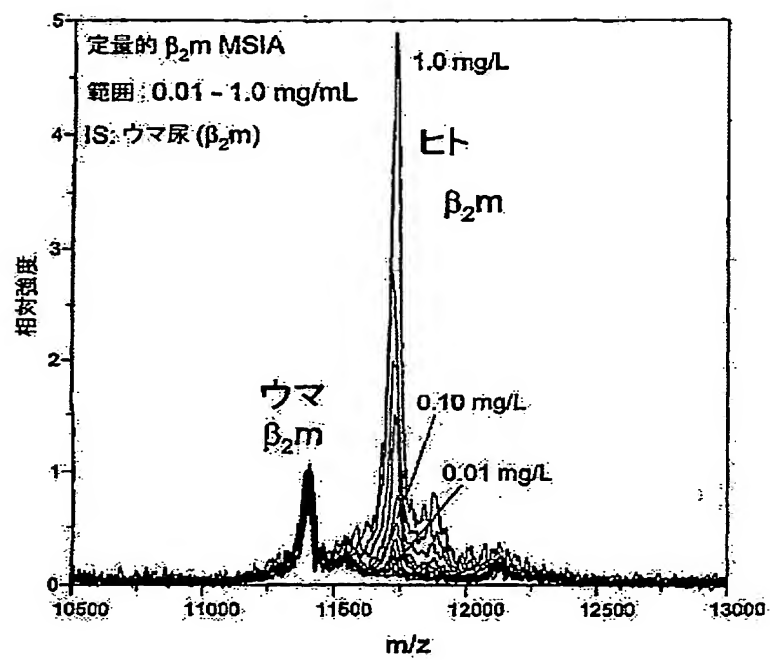


図3a

【図 3 b】

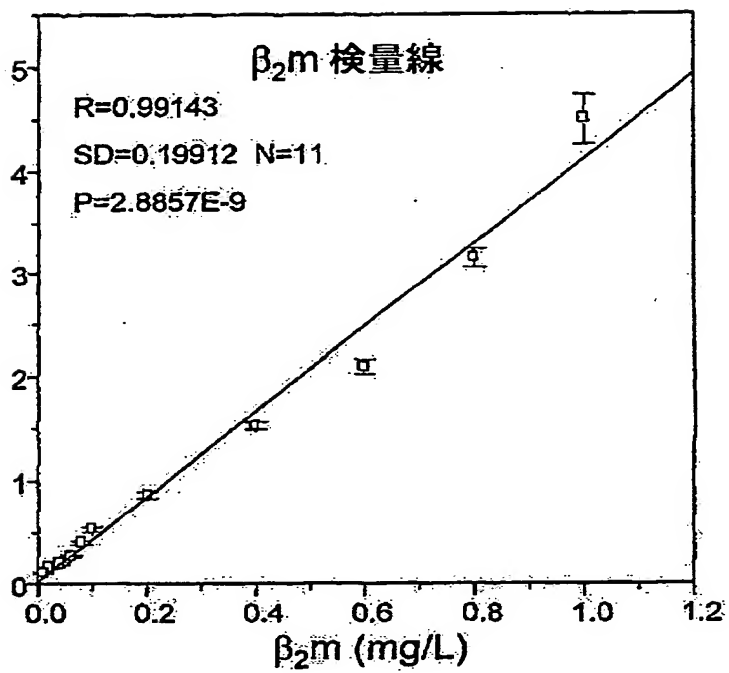


図3b

【図4】

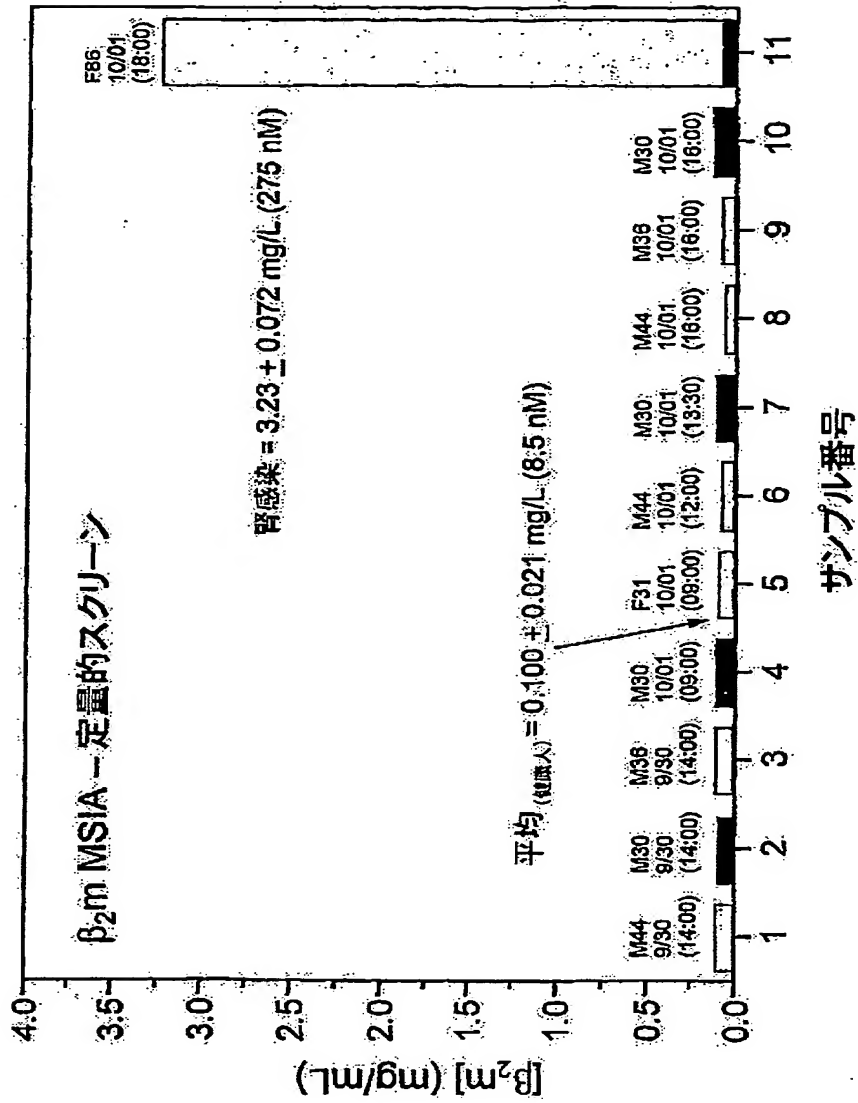


図4

【図5】

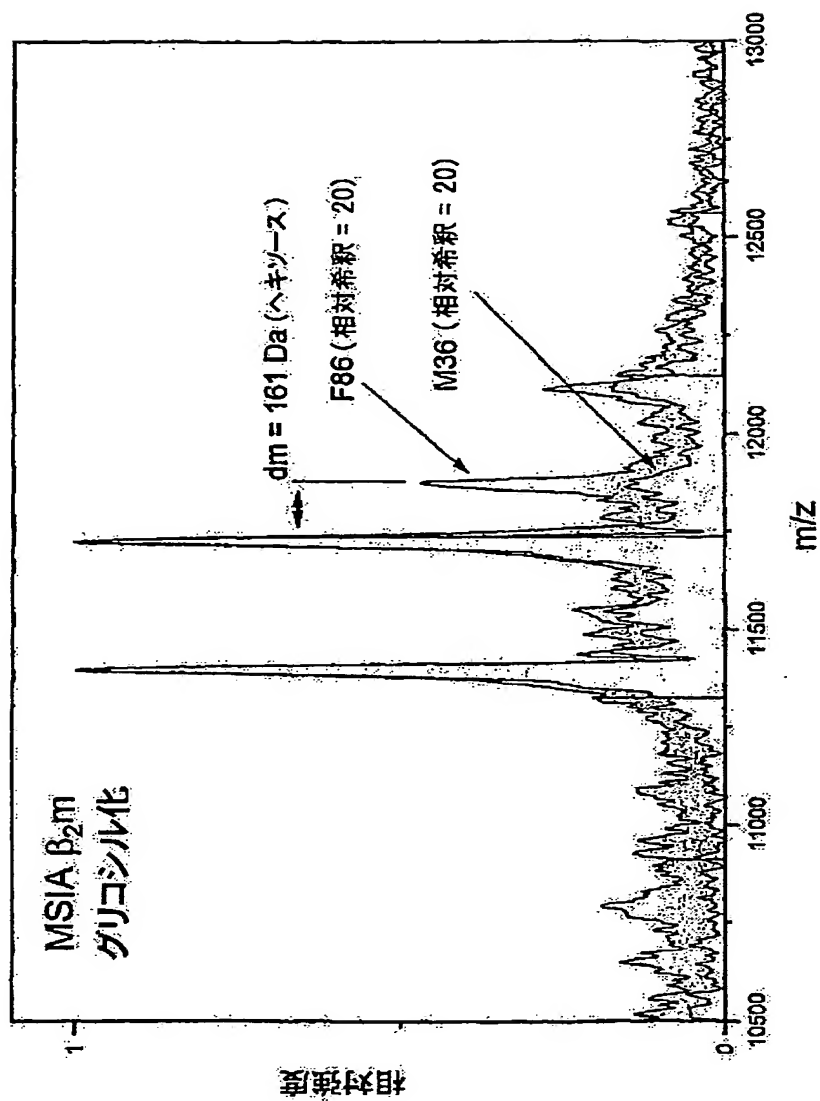


図5

【図6】

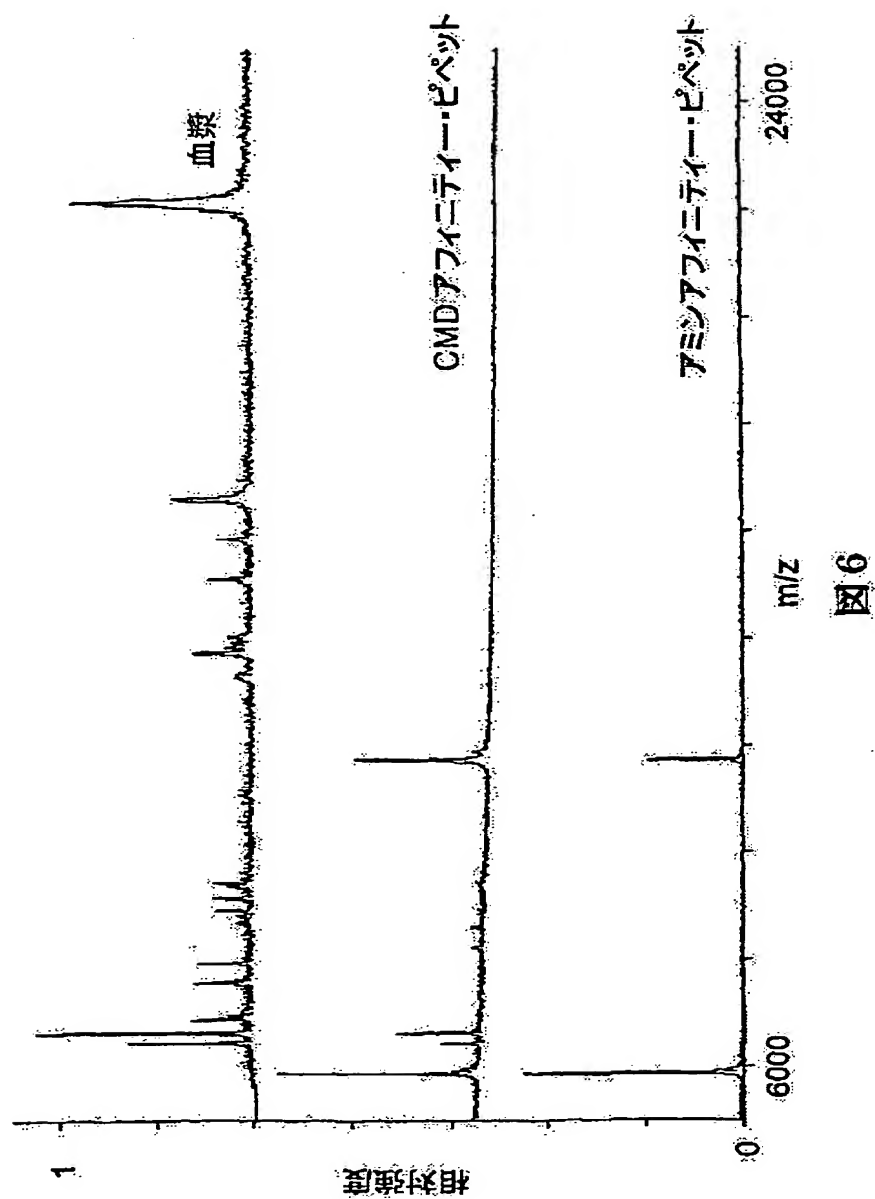


図6

【図7A】

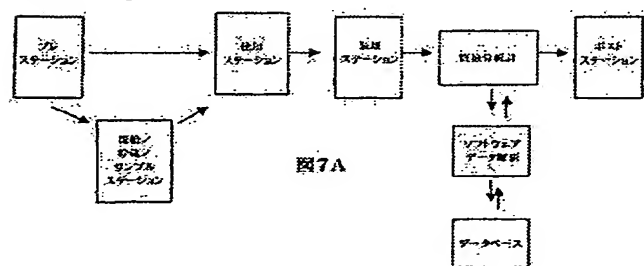


図7A

【図7B】

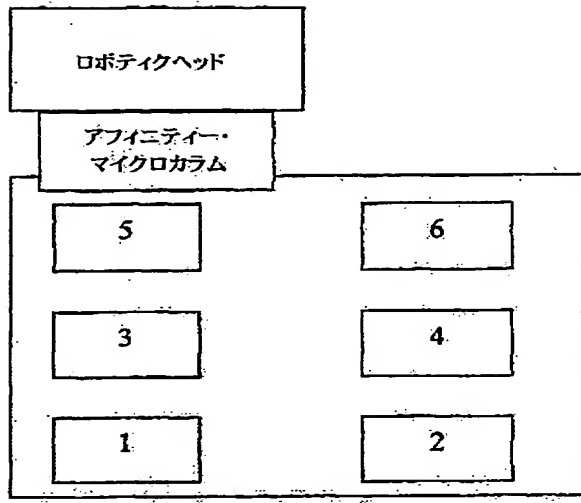


図7B

【図9】

標準化積分平均

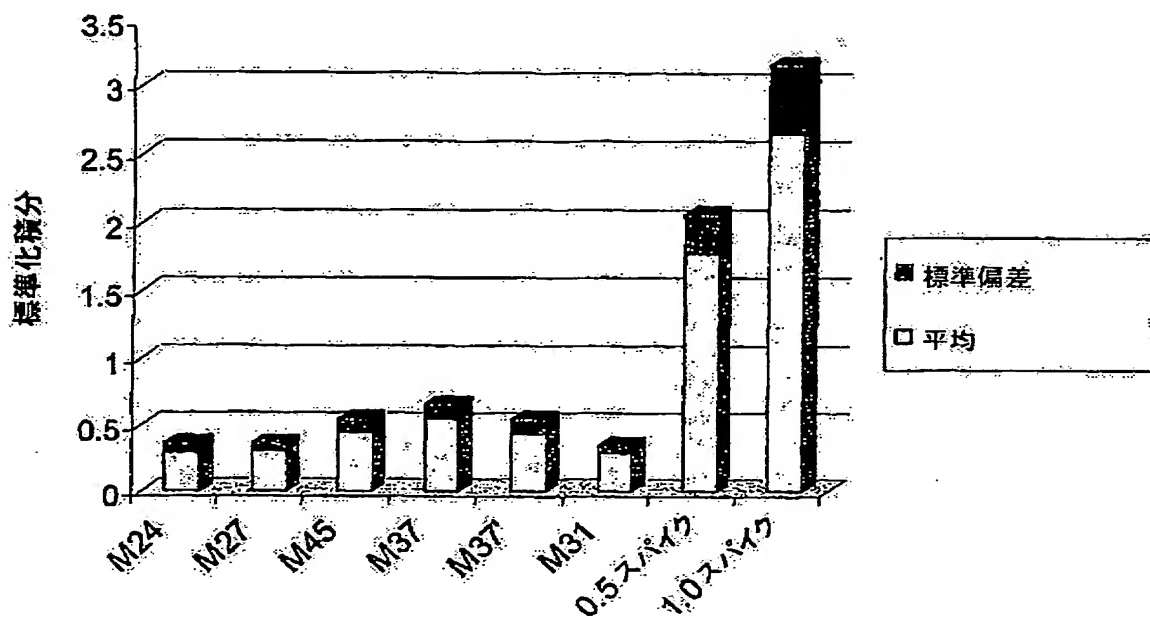


図9

【図11a】

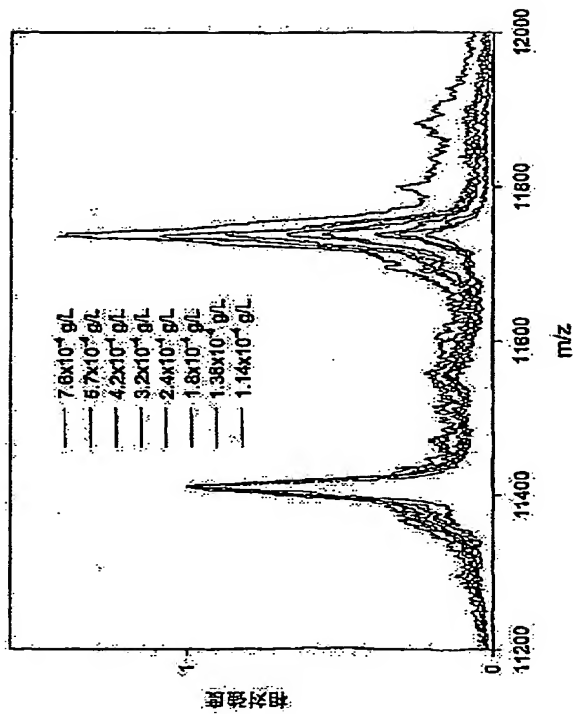


図11a

【図11b】

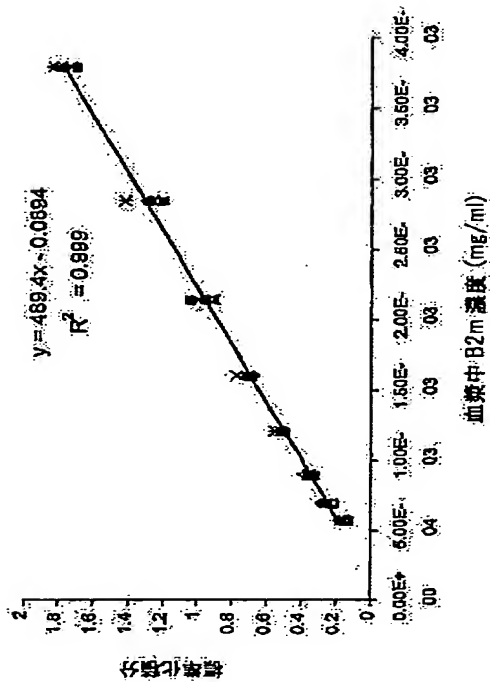


図11b

【図 12】

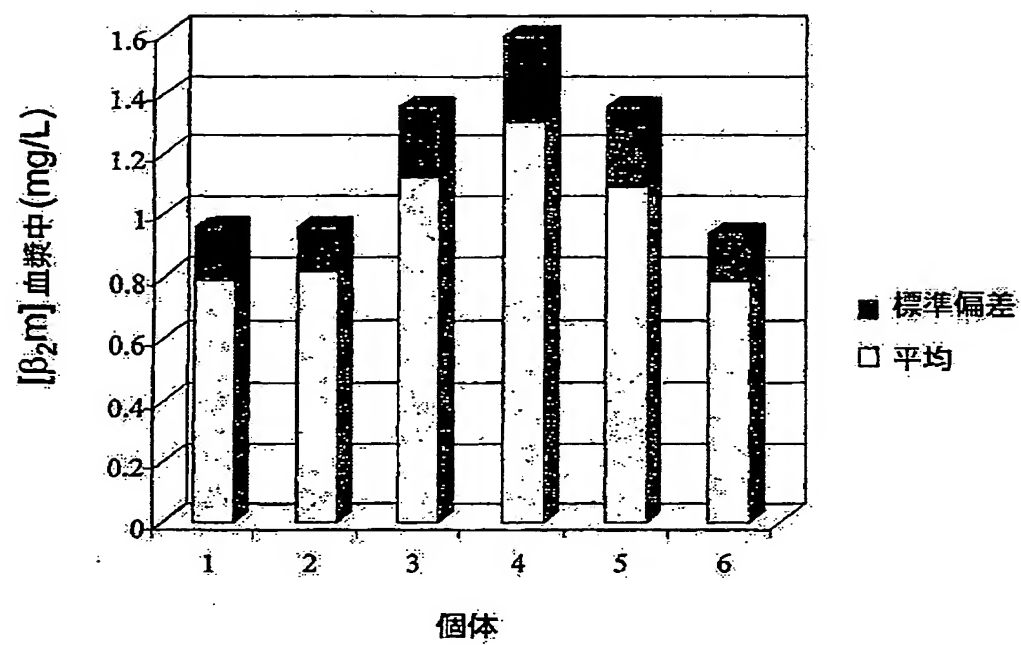


図12

【図14】

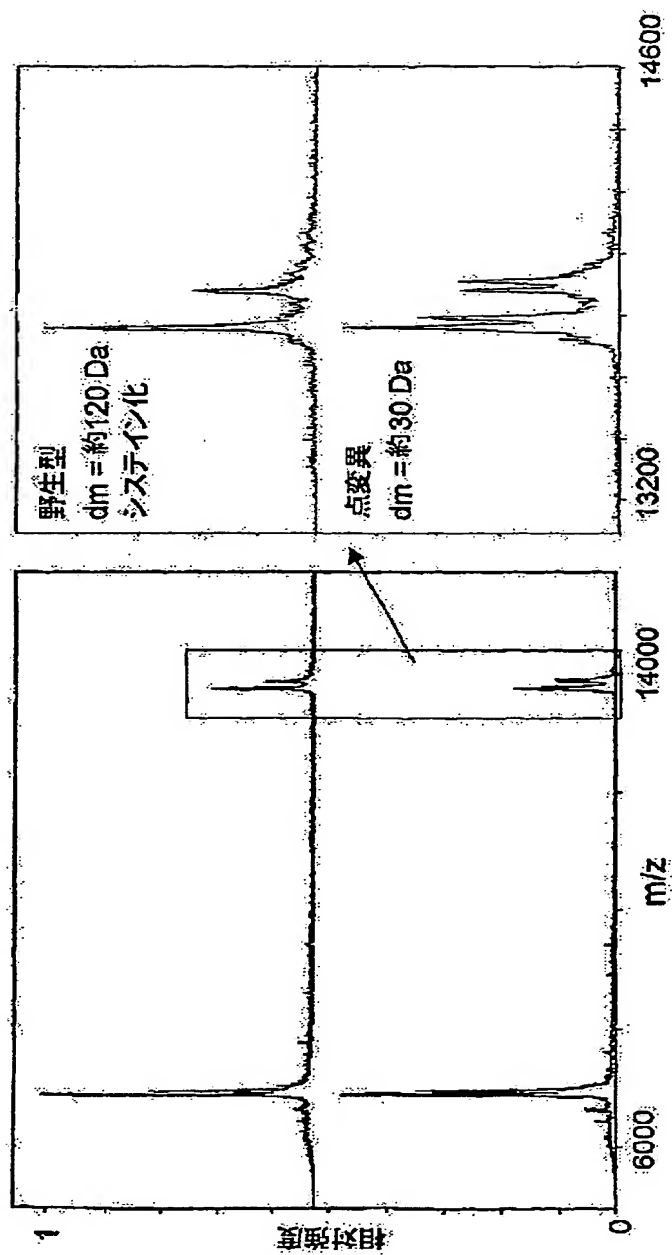


図14

【 図 1 5 】

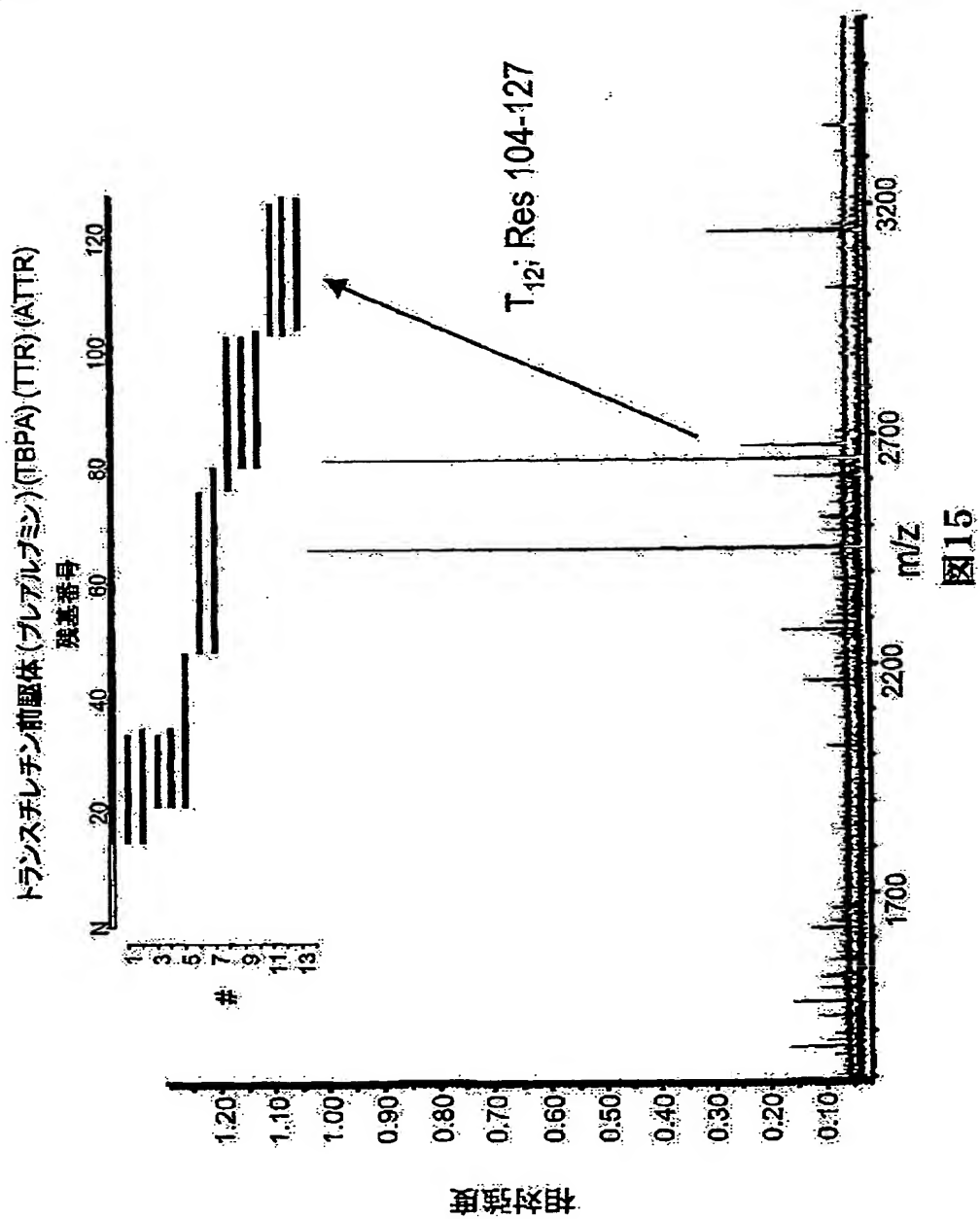


図15

【 図 16 】

dm = 29.988 Da トリプシンフラグメント中 104-127

2 種の可能な変異 :

Ala109Thr [GCC - TCC]; dm = 30.011 Da;

Thr119Met [ACG - ATG]; dm = 29.992 Da

“シカゴ”変異体、非アミロイド

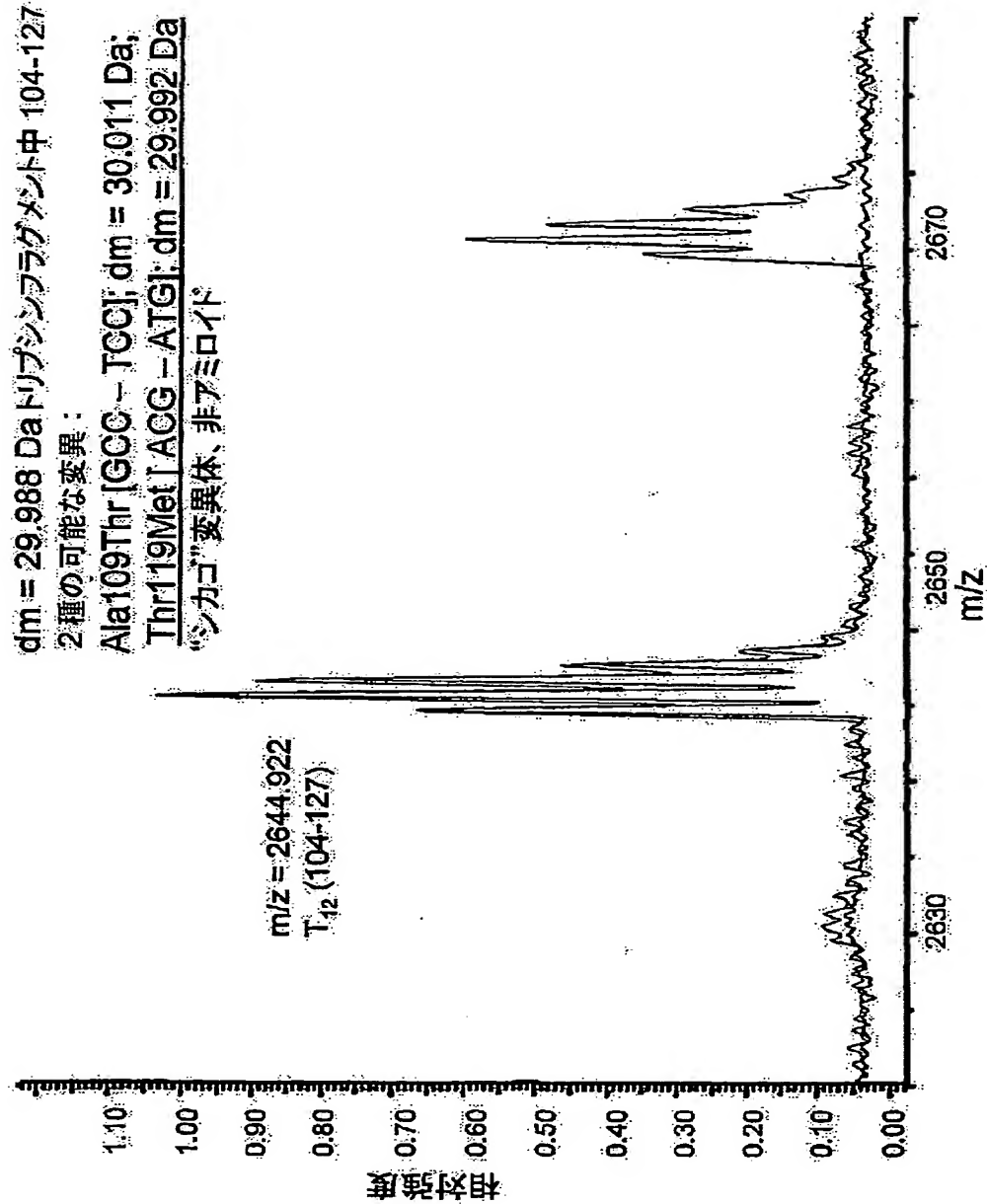


図16

【図 17 A】

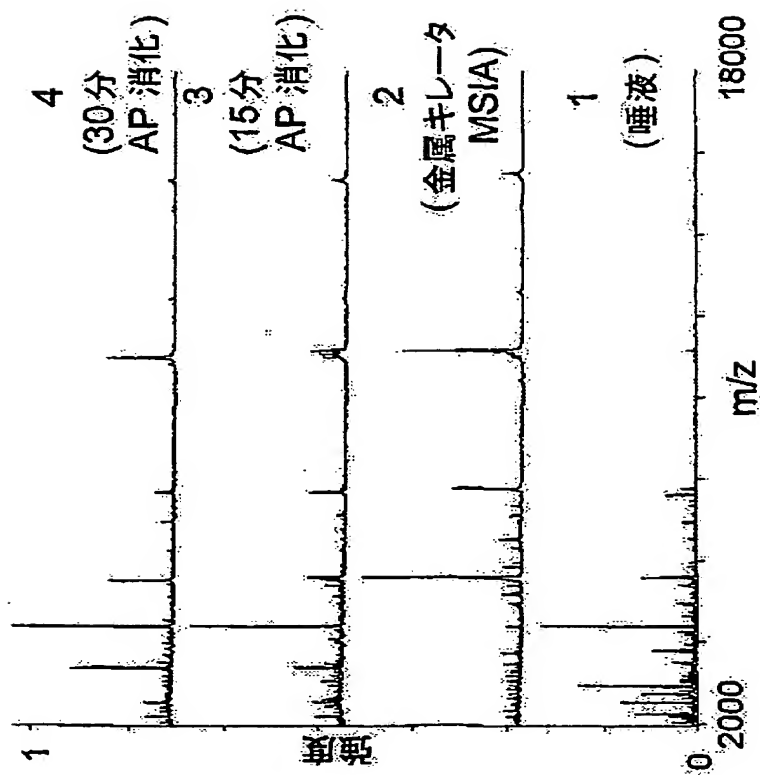


図17A

【図 17 B】

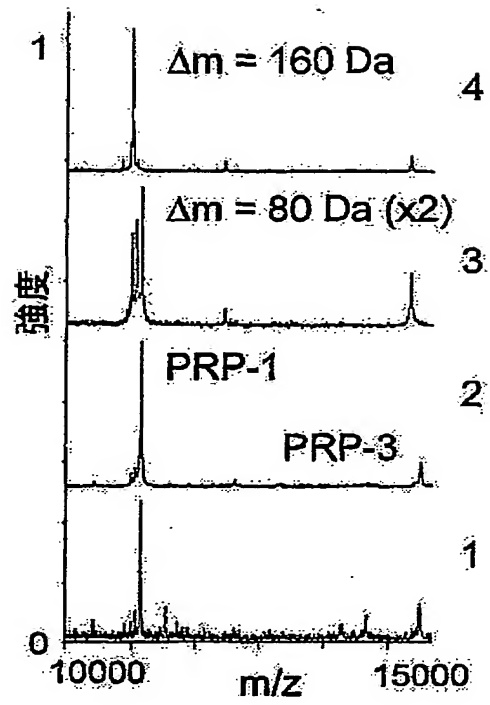


図17B

【 図 1 8 】

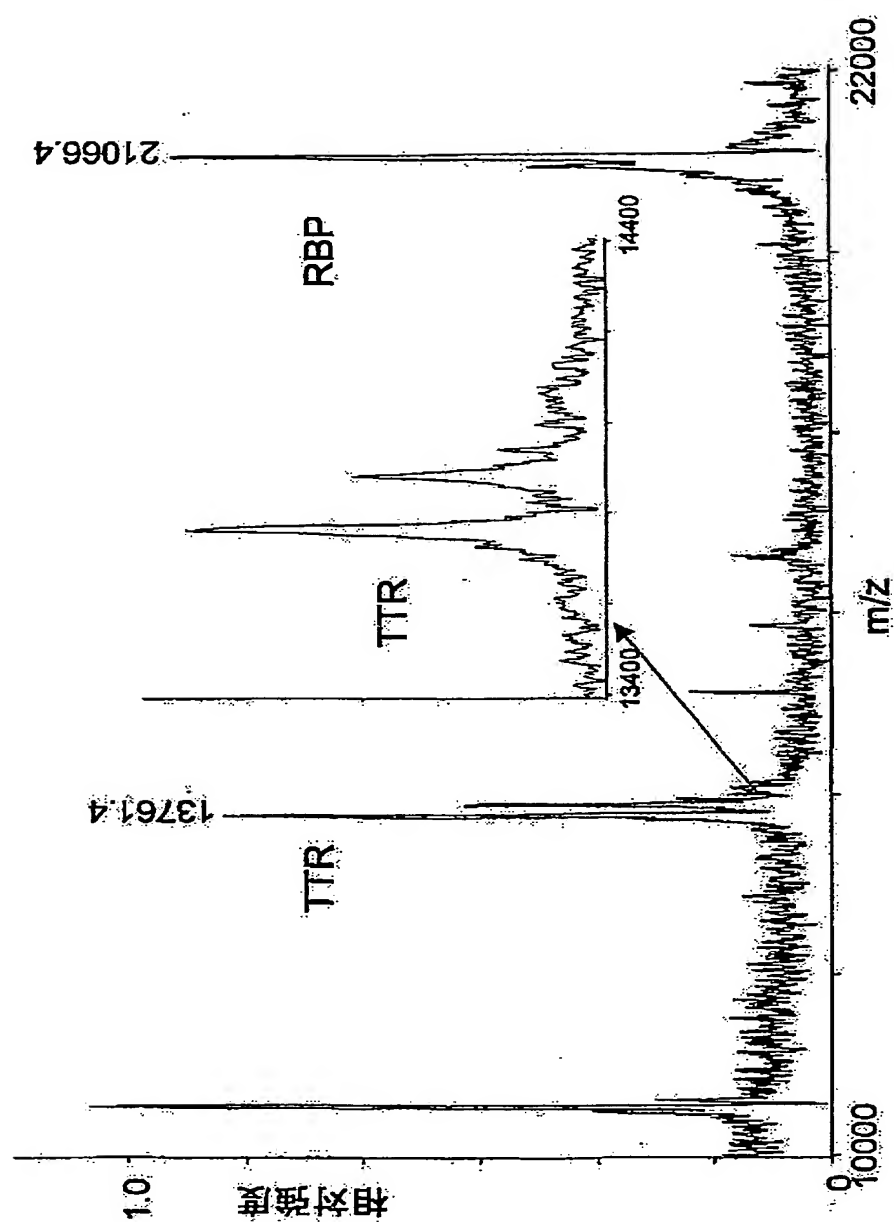


図18

【図19】

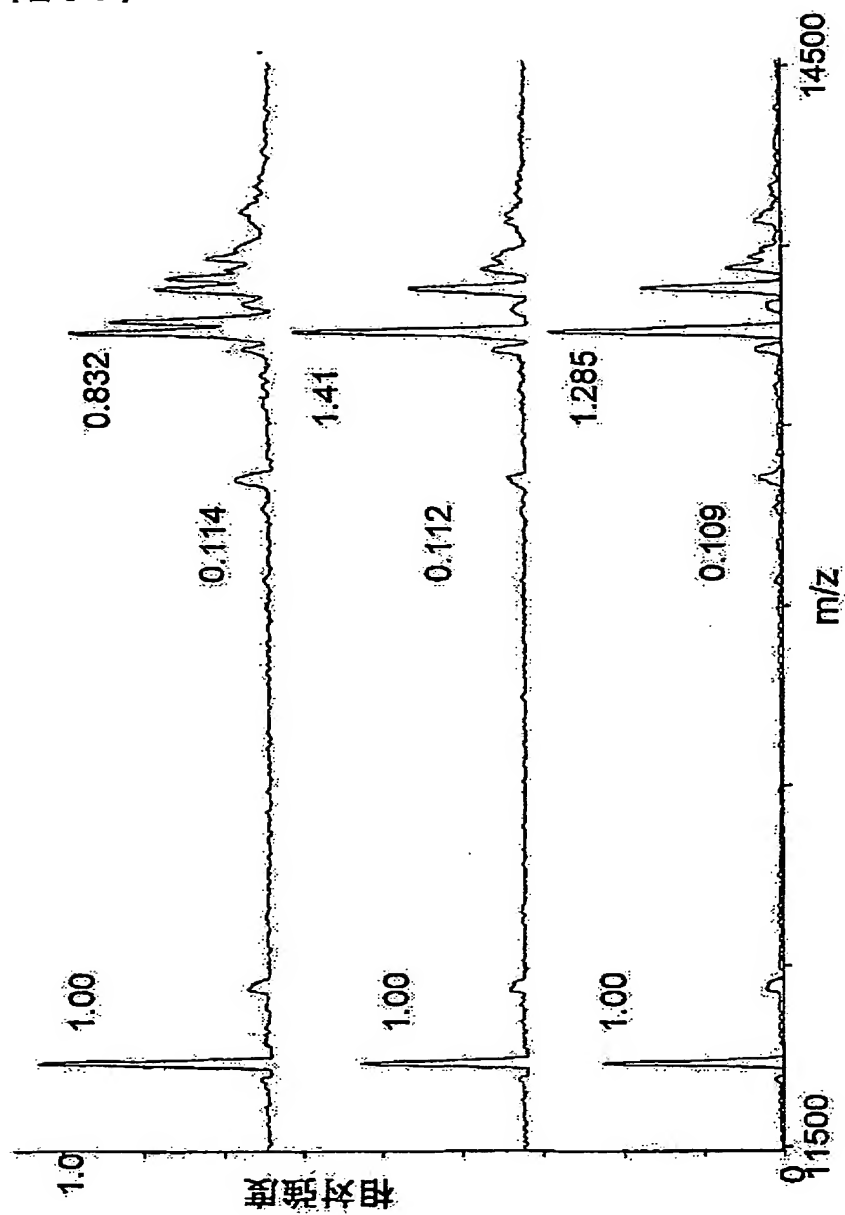


図19

【図 20】

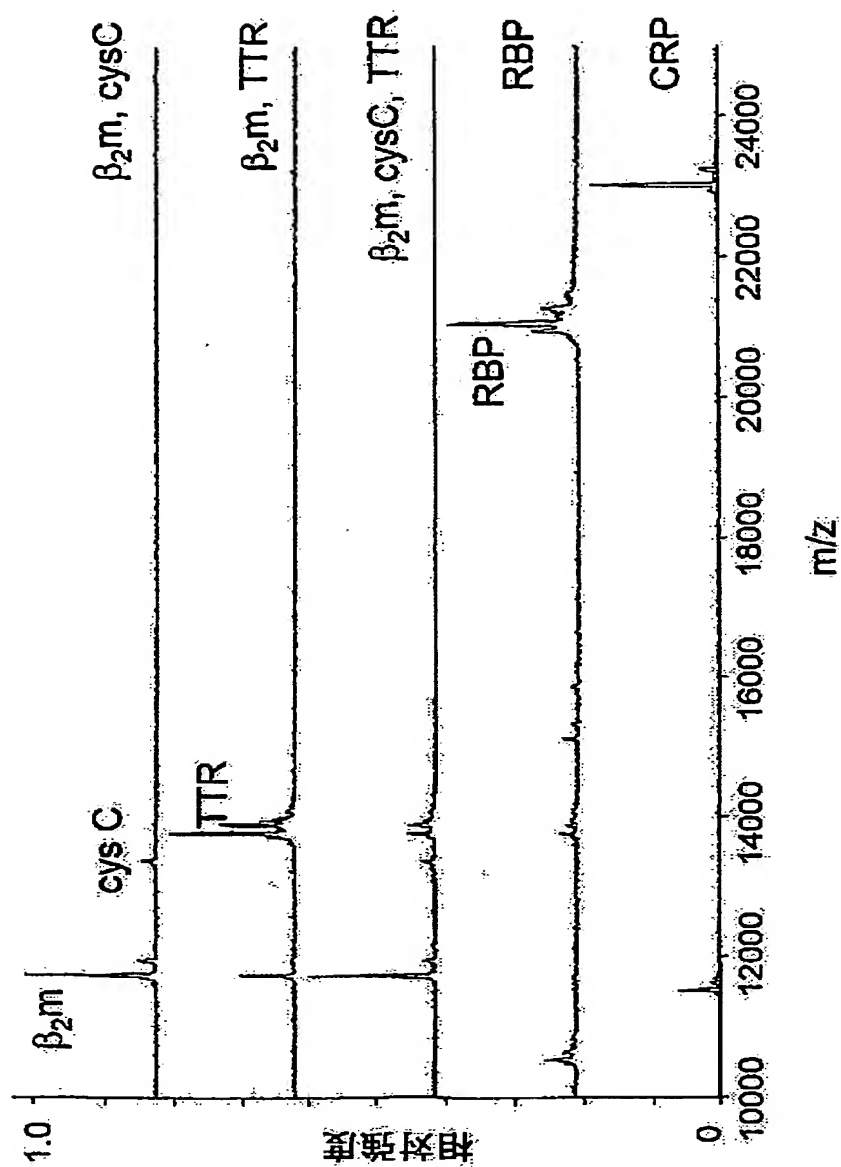


図 20

【図 21】

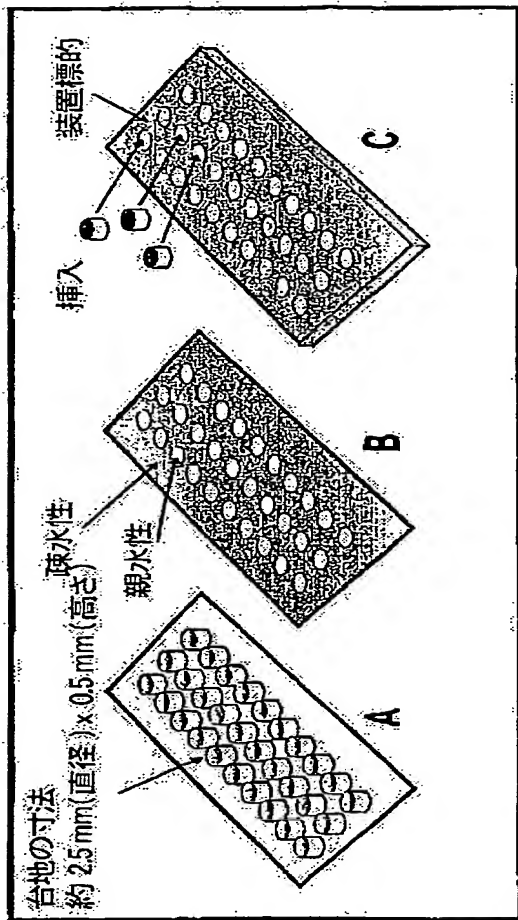


図21

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

PCT

(43) International Publication Date
17 October 2002 (17.10.2002)

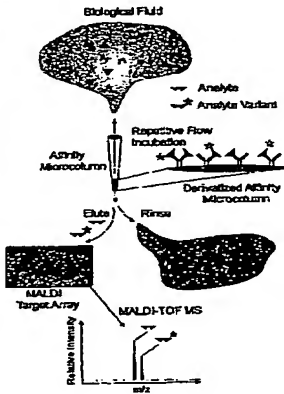
PCT

(10) International Publication Number
WO 02/082051 A2

- (51) International Patent Classification: G01N
(21) International Application Number: PCT/US02/01541
(22) International Filing Date: 15 January 2002 (15.01.2002)
(23) Filing Language: English
(24) Publication Language: English
(50) Priority Data:
66/252,530 17 January 2001 (17.01.2001) US
66/252,552 17 January 2001 (17.01.2001) US
(71) Applicant and
(72) Inventor: TELFER, Kenneth, A. (US,US); 3327 W. Del
Camp Cir., Mesa, AZ 85202 (US)
(73) Inventor: NELSON, Randall, W.; 11221 S. 51st St.,
83013, Phoenix, AZ 85044 (US); GRUBER, Karl, A.;
19715 N. University, 85241, Tempe, AZ 85281 (US)

(74) Agent: HATHORSON, Kenneth, E.; The Hathorson Law
Firm, S.C. 81, 405 W. Southern Ave., Tempe, AZ 85281
(US)(51) Designated States (national): AU, CA, CN, JP, KR, KZ,
RU,
(54) Designated States (regional): Eurasian patent (AM, AZ,
BY, EG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE,
CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SI, TR).Published:
without international search report and to be republished
upon receipt of that reportFor two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guide-
lines: Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: AN INTEGRATED HIGH THROUGHPUT SYSTEM FOR THE ANALYSIS OF BIOMOLECULES



(57) Abstract: The present invention provides an integrated system capable of selectively extracting and concentrating specific biomolecules from biological fluids for subsequent high-performance analysis, quantifying targeted proteins, recognizing variants of targeted biomolecules (e.g., splice variants, point mutations and posttranslational modifications) and elucidating their nature, analyzing for, and identifying, libraries interacting with targets, biomolecules, and high-throughput screening of large populations of samples using a single, unified, nonchemical, multiplexed and parallel processing platform. The preferred embodiment of the integrated system comprises molecular traps, such as affinity microcolumns, derivatized mass spectrometer targets, mass spectrometers capable of multi-sample input and robotics with precise syringe and/or pipette systems. The present invention also includes methods and processes for use of the individual components and the integrated system in biological applications. Furthermore, the preferred embodiment of the present invention provides for the preparation and/or processing of multiple separate devices and/or complex to accomplish high throughput analysis.

WO 02/082051 A2

WO 02/88205.1

PCT/US02/01541

AN INTEGRATED HIGH THROUGHPUT SYSTEM FOR THE ANALYSIS OF BIOMOLECULES

This application is a continuation-in-part of pending provisional applications 60/262,530 and 60/262,852, both filed on January 17, 2001.

FIELD OF THE INVENTION

The present invention is related to the field of proteomics. More specifically, the present invention is a method and device for rapid identification and characterization of biomolecules recovered from biological media. Additionally, the present invention includes the ability to process numerous different samples simultaneously (high throughput analysis).

BACKGROUND OF THE INVENTION

Recent advances in human genome sequencing have propelled the biological sciences into several new and exciting arenas of investigation. One of these arenas, proteomics, is largely viewed as the next wave of concerted, worldwide biological research. Proteomics is the investigation of gene products (proteins), their various different forms and interacting partners and the dynamics (time) of their regulation and processing. In short, proteomics is the study of proteins as they function in their native environment with the overall intention of gaining a further, if not complete, understanding of their biological function. Such studies are essential in understanding such things as the mechanisms behind genetic disorders or the influences of drug mediated therapies, as well as potentially becoming the underlying foundation for further clinical and diagnostic analyses.

There are several challenges intrinsic to the analysis of proteins. First, and foremost, any protein considered relevant enough to be analyzed resides *in vivo* in a complex biological environment or media. The complexity of these biological media present a challenge in that, oftentimes, a protein of interest is present in the media at relatively low levels and is essentially masked from analysis by a large abundance of other biomolecules, e.g., proteins, nucleic acids, carbohydrates, lipids and the like. Technologies currently employed in proteomics are only able to overcome this fundamental problem by first fractionating the entire biological media using the relatively old technology of two-dimensional (2D) sodium dodecyl sulphate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), wherein numerous proteins are

WO 01/082051

PCT/US02/01541

simultaneously migrated using a gel medium, in two dimensions as a function of isoelectric point and molecular size. In order to ensure migration in a predictable manner, the proteins are first reduced and denatured, a process that destroys the overall structures of the proteins and voids their functionality.

5 Present day state-of-the-art proteomics involves the identification of the proteins separated using 2D-PAGE. In this process, gel spots containing separated proteins are excised from the gel medium and treated with a high-specificity enzyme (most commonly trypsin) to fragment the proteins. The resulting fragments are then subjected to high-accuracy mass analysis using either electrospray ionization (ESI) or
10 matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS). The resulting data, in the form of absolute molecular weights of the fragments, and knowledge of the enzyme specificity are used *in silico* to search genomic or protein databases for information correlating to the empirical data on the fragments. Analytical methods and searching protocols, refined over the past seven
15 years, have evolved to a point where only a few proteolytic fragments, determined with high mass accuracy, are needed to identify a gel-separated protein as being present in a certain gene.

However, identification of the gene producing a protein of interest is only the first step in the overall, much larger process of determining protein
20 structure/functionality. Numerous questions that arise cannot be answered by the 2D-PAGE/MS approach. One major issue deals with the primary structure of the protein. During the commonly practiced identification process, at most, fifty percent of the protein sequence is viewed, leaving at least fifty percent of the protein unanalyzed. Given that potentially numerous splice variants, point mutations, and post-
25 translational modifications exist for any given protein, many variants and modifications present within a protein will ultimately be missed during the identification process - many of which are responsible for disease states. As such, proteins are not viewed in the full structural detail needed to differentiate (normal) functional variants from (disease-causing) dysfunctional variants.

30 Furthermore, current identification processes make no provision for protein quantitation. Because many disease states are created or indicated by elevated or decreased levels of specific proteins and/or their variants, protein quantitation is a

WO 02/082051

PCT/US02/01541

very important component of proteomics. Presently, protein quantitation from gels is performed using staining approaches that inherently have a relatively high degree of variability, and thus inaccuracy. The staining approaches can be replaced using isotope-coded affinity tags (ICAT) in conjunction with mass spectrometric quantification of proteolytic fragments generated from 2D-PAGE. However, the ICAT approach is still subjective to the aforementioned protein variants in that protein variants will yield mass-shifted proteolytic fragments that will not be included in the quantification process. Likewise, other approaches, such as ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) and RIA (radioimmunoassay), are equally subjected to the complications of quantifying a specific protein in the presence of its variants. Lacking the ability to resolve a target protein from its variants, these techniques will essentially monitor all protein variants as a single compound, a process that is oftentimes misleading in that a disease may be caused/indicated by elevated level of only a single variant, not the cumulative level of all the variants.

Moreover, the 2D-PAGE/MS approaches make no provision for exploring protein-ligand (e.g., other proteins, nucleic acids or compounds of biological relevance) interactions. Because denaturing conditions are used during protein separation, all protein-ligand interactions are disrupted, and thus are out of the realm of investigation using the identification approach. Separate other approaches focus specifically on the analysis of protein-ligand interactions. The most frequently used of these are the yeast two-hybrid (Y2H) and phage display approaches, which use *in vivo* molecular recognition events to trigger the expression of genes that produce reporter proteins indicating a biomolecular interaction, or selectively amplify high-affinity binding partners, respectively. Other instrumental approaches rely on biosensors utilizing universal physical properties or tags (e.g., surface plasmon resonance or fluorescence) as modes of detection. The two major limitations of these approaches is that they are generally slow and that interacting partners pulled from biological media are detected indirectly, yielding no specific or identifying information about the binding partner.

Lastly, none of the aforementioned approaches are favorable to large-scale, high-throughput analysis of specific proteins, their variants and their interacting partners in large populations of subjects. All of the aforementioned approaches

WO 02/082051

PCT/US02/01541

require several hours (2D-PAGE) to several weeks (V2H) to perform on a single sample. As such, time and monetary expenses preclude application to the hundreds-to-thousands of samples (originating from hundreds-to-thousands of individuals) necessary in proteomic, clinical, and diagnostic applications.

To date, there are no universal, integrated systems capable of the high-throughput analysis of proteins for all of the aforementioned reasons. Thus, there exists a pressing need for new and novel technologies able to analyze native proteins present in their natural environment. Encompassed in these technologies are: 1) the ability to selectively retrieve and concentrate specific proteins from biological media for subsequent high-performance analyses, 2) the ability to quantify targeted proteins, 3) the ability to recognize variants of targeted proteins (e.g., splice variants, point mutations and posttranslational modifications) and to elucidate their nature, 4) the capability to analyze for, and identify, ligands interacting with targeted proteins, and, 5) the potential for high-throughput screening of large populations of samples using a single, economical platform.

All publications and patent applications are herein incorporated by reference to the same extent as if each individual publication or patent application was specifically and individually indicated to be incorporated by reference. Although the present invention has been described in some detail by way of illustration and example for purposes of clarity and understanding, it will be apparent that certain changes and modifications may be practiced within the scope of the appended claims.

SUMMARY OF INVENTION

It is an object of the present invention to provide an integrated system capable of selectively retrieving and concentrating specific biomolecules from biological media for subsequent high-performance analyses, quantifying targeted proteins, recognizing variants of targeted biomolecules (e.g., splice variants, point mutations and post-translational modifications) and elucidating their nature, analyzing for, and identifying, ligands interacting with targeted biomolecules, and high-throughput screening of large populations of samples using a single, unified, economical, multiplexed and parallel processing platform.

It is another embodiment of the present invention to provide an integrated system that comprises molecular traps, such as affinity microcolumns, derivatized

WO 02/042051

PCT/US02/01541

mass spectrometer targets, mass spectrometers capable of multi-sample input and robotics with processing/data analysis interactive database software that accomplish the high throughput analysis.

It is yet another object of the present invention to provide individual components for the integrated system, such as molecular traps, derivatized targets and the like.

It is a further object of the present invention to provide a high throughput embodiment of the present invention that uses robotics for serial preparation and parallel processing of a large number of samples simultaneously.

It is yet a further object of the present invention to provide methods and processes for use of the individual components and the integrated system in biological applications.

It is still yet another object of the present invention to provide a device and method for the identification of point mutations and variants of analytes using an integrated system using high throughput analysis.

The novel features that are considered characteristic of the invention are set forth with particularity in the appended claims. The invention itself, however, both as to its structure and its operation together with the additional objects and advantages thereof will best be understood from the following description of the preferred embodiment of the present invention when read in conjunction with the accompanying drawings. Unless specifically noted, it is intended that the words and phrases in the specification and claims be given the ordinary and accustomed meaning to those of ordinary skill in the applicable art or arts. If any other meaning is intended, the specification will specifically state that a special meaning is being applied to a word or phrase. Likewise, the use of the words "function" or "means" in the Description of Preferred Embodiments is not intended to indicate a desire to invoke the special provision of 35 U.S.C. §112, paragraph 6 to define the invention. To the contrary, if the provisions of 35 U.S.C. §112, paragraph 6, are sought to be invoked to define the invention(s), the claims will specifically state the phrases "means for" or "step for" and a function, without also reciting in such phrases any structure, material, or act in support of the function. Even when the claims recite a "means for" or "step for" performing a function, if they also recite any structure,

WO 02/082051

PCT/US02/01541

material or acts in support of that means of step, then the intention is not to invoke the provisions of 35 U.S.C. §112, paragraph 6. Moreover, even if the provisions of 35 U.S.C. §112, paragraph 6, are invoked to define the inventions, it is intended that the inventions not be limited only to the specific structure, material or acts that are described in the preferred embodiments, but in addition, include any and all structures, materials or acts that perform the claimed function, along with any and all known or later-developed equivalent structures, materials or acts for performing the claimed function.

DETAILED DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Fig. 1 is an illustration of the MSIA procedure. Analytes are selectively retrieved from solution by repetitive flow through a receptor-derivatized affinity pipette. Once washed of the non-specifically bound compounds, the retained species are eluted onto a mass spectrometer target or target array using a MALDI matrix (in the preferred embodiment). MALDI-TOF MS then follows, with analytes detected at precise m/z values. The analyses are qualitative by nature but can be made quantitative by incorporating mass-shifted variants of the analyte into the procedure for use as internal standards.

Fig. 2 β_2 -microglobulin MSIA screening of biological fluids. Samples were prepared by dilution of the biological fluid with HBS (H_2O for standalone MALDI-TOF) and repetitive flow incubation through the affinity pipette. Affinity pipettes were washed using HBS and water before elution of retained compounds directly onto a mass spectrometer target using ACCA (saturated in 1:2, ACN: H_2O ; 0.2% TFA). (A) Human tears. (B) Human plasma. (C) Human saliva – the saliva required an additional rinse with 0.05% SDS (in water) to reduce non-specific binding. (D) Human urine. In all cases, β_2m was efficiently retrieved from the biological fluids using the flow-incubate/rinse procedure. The masses determined for the β_2m (using external calibration) were within $\sim 0.1\%$ of the calculated value ($MW_{calc} = 11,729.7$; $MW_{tears} = 11,735$; $MW_{plasma} = 11,734$; $MW_{saliva} = 11,742$; $MW_{urine} = 11,735$). Illustrating diverse biological fluid screening by MSIA for a directed, rapid, sensitive and accurate analysis.

WO 02/082051

PCT/US02/01541

Fig. 3a Quantitative β_2m -MSIA – working curve. Representative spectra of data used to generate the working curve. Human β_2m concentrations of 0.01 – 1.0 mg/L were investigated. Equine β_2m (MW = 11,396.6) was used as an internal standard.

5 Fig. 3b Working curve generated using the data represented in Fig. 3a. The two-decade range was spanned with good linearity ($R^2 = 0.983$) and low standard error (~ 5%). Error bars reflect the standard deviation of ten repetitive 65-laser shots spectra taken from each sample. These figures illustrate quantitative MSIA performed via β_2m -affinity pipettes.

10 Fig. 4 Quantitative β_2m -MSIA – screening. Human urine samples from five individuals were screened over a period of two days. The average value determined for healthy individuals (10-samples; 4-individuals (3 male; 1 female) ages 30-44 years) was 0.100 ± 0.021 mg/L. The level determined for an 86-year old female with a recent urinary tract infection indicated a significant increase in β_2m concentration (3.23 ± 0.072 mg/L).

15 Fig. 5 MSIA showing elevated level of glycosylated β_2m in a 86-year old female (dark gray). During MSIA, a second signal is observed at $\Delta m = +161$ Da, indicating the presence of glycosylated β_2m . MSIA is able to adequately resolve the two β_2m forms, resulting in a more accurate quantification of the nascent β_2m and possible quantification of the glycoprotein. Such differentiation is important considering that the two β_2m forms originate from (or are markers for) different ailments. MSIA of a healthy individual, showing little glycosylation, is given for comparison (light gray).

20 Fig. 6 Surface directed MSIA for defined biological fluid/ β_2m -microglobulin specificity. Use of polyclonal anti- β_2m affinity pipettes linked via carboxymethyl dextran amplification or amine base support chemistries enable differentiation of specifically bound versus non-specifically bound compounds during biological fluid/MSIA. Samples were prepared from biological fluid and used as in Figure 2. (A) Human plasma. (B) Human plasma through CMD amplified β_2m affinity pipette. (C) Human plasma through amine/glutaraldehyde coupled β_2m affinity pipette. Direct analysis of human plasma spectra (top spectrum) lacks β_2m mass signature ($MW_{\beta_2m} =$

25

30

WO 02/082051

PCT/US02/01541

11734). CMD amplified affinity pipette chemistry target β_{2m} while exhibiting non-specifically bound compounds (middle spectrum). Only in the last case was β_{2m} efficiently retrieved from the biological fluid with low non-specifically bound compounds (bottom spectrum). This illustrates a preferred surface in the directed analysis of blood born biological fluid biomarkers using discrete affinity pipettes for specific mass detection.

Fig. 7a is a schematic illustration describing the integrated system for high-throughput analysis of biomolecules from biological media.

Fig. 7b is an expanded schematic illustration of the used station, which is composed of microcolumn-integrated robotics having multiple positions for chemical modification, microcolumn functionalization, biological fluids analysis, transfer and the like.

Fig. 8 is an illustration of a high-throughput semi-quantitative analysis of β_{2m} MSIA. β_{2m} from human plasma samples using the integrated system and methods described in the present invention.

Fig. 9 shows bar graph analysis of the data shown in Fig. 8. Each spectrum shown in Fig. 8 was normalized to the equine β_{2m} signal through baseline integration, and the normalized integral for the human β_{2m} signal determined. All β_{2m} integrals from spectra obtained from sample from the same individual were averaged and the standard deviation calculated. In the same way, the integrals for the samples spiked with 0.5 and 1.0 μL solution of 10^{-3} mg/mL β_{2m} were calculated and averaged. Plotted in this figure are the average values of the normalized human β_{2m} integrals for the samples from the six individuals and the spiked samples. The bar graph clearly establishes increased β_{2m} levels in the spiked samples, illustrating the value of the high-throughput semi-quantitative analysis performed with the system and methods described in this invention in establishing increased β_{2m} levels in human blood that are associated with various disease states.

Fig. 10 is an illustration of a high-throughput quantitative analysis of β_{2m} from human plasma samples using the integrated system and methods described in this invention.

WO 02/082051

PCT/US02/01541

- Fig. 11a and 11b illustrate the construction of a calibration curve from the data for the standard samples shown in Fig. 10 and for the purpose of determining the β_2m concentrations in the human plasma samples screened via the high-throughput analysis using the integrated system and methods described in this invention.
- Fig. 12 shows bar analysis of the data shown above using the standard curve constructed above. Each spectrum for the 88 samples in Fig. 10 was normalized to the equine β_2m signal through baseline integration, and the normalized integral for the human β_2m signal determined. All human β_2m integrals for the same individual were averaged and the standard deviation calculated. The values of the averaged integrals were substituted in the equation derived from the standard curve, Fig. 11b, and the concentration of human β_2m was calculated for each individual. The range of concentrations determined was from 0.75 to 1.25 mg/L.
- Fig. 13 is an illustration of a qualitative high-throughput screening of transthyretin (TTR) for posttranslational modification (PTM) and point mutations (PM) using the integrated system and methods described in this invention.
- Fig. 14 illustrates identification of the posttranslational modifications and point mutations observed in the high-throughput TTR analysis using the integrated system and methods described in this invention.
- Fig. 15 illustrates the identification of point mutation via incorporation of derivatized mass spectrometer target platforms in the system and methods described in this invention.
- Fig. 16 illustrates the use of a high-resolution reflectron mass spectrometry as part of the integrated system and methods described in this invention in determining the identity of the point mutations detected in the analysis of the plasma samples shown in Fig. 15.
- Fig. 17a Concerted biofluid phosphate analysis: chelator affinity pipettes with alkaline phosphatase functionalized target array. (1) Human whole saliva (10 μ L diluted 10 fold). (2) sample in (1) through EDTA/ Ca^{2+} affinity pipettes. (3) sample in (2) eluted via 10mM HCl addition and stamped onto AP-BRP incorporating 50mM borate buffer pH=10 buffer exchange and fifteen minute

WO 01/082051

PCT/US02/01541

phosphate digest (50°C). (4) sample in (3) with extended thirty minute digest. Direct analysis of ten by dilution of human saliva significantly lacks proline rich protein-1 (PRP-1), the serine modified phosphate rich protein of interest.

Fig. 17b Spectrum in (2) shows EDTA/Ca²⁺ affinity pipette capture of two phosphate rich proteins, PRP-1 and PRP-3. Mass signature of dephosphorylation is evident in spectral trace (3) and complete in (4). Illustrating multi-analyte detection accompanied by partial and complete dephosphorylation of phospho-proteins captured/digested out of biological fluid for post-translational analysis (i.e., phosphorylation events).

Fig. 18 MSIA delineation of multi-protein complexes between retinol binding protein (RBP) and transthyretin (TTR). Polyclonal anti-RBP affinity pipettes were formed via glutaraldehyde mediated amine base support surface coupling. Human plasma was prepared and used as in Fig. 8. MSIA shows *in vivo* affinity retrieval of RBP (MW = 21,062 Da) and complexed TTR (MW = 13,760 Da). Illustrating protein interactions existing in native protein complexes.

Fig. 19 Simultaneous rapid monitoring of multi-analytes for relative abundance.

Amine activated, polyclonal anti- β_2m /CysC/TTR affinity pipettes are used to rapidly capture their respective analytes out of human plasma (50 fold diluted in HBS). The figure illustrates one of the uses for multi-antibody affinity pipettes to β_2m , CysC and TTR to rapidly monitor for biological fluid level modulation and to quantify a modulated protein event from their normalized relative abundance. The figure illustrates one of the uses of affinity pipettes for monitoring potential β_2m /CysC levels in acute phase of viral infection (e.g., AIDS) or fibrin formation from β_2m or TTR.

Fig. 20 Rapid monitoring of extended multi-analyte affinity pipettes.

Combinations/individual polyclonal antibody affinity pipettes incorporating β_2m , TTR, RBP, Cystatin C or CRP capture respective analytes from human plasma (50 fold dilution in HBS). This figure illustrates one of the uses for multi/single-antibody affinity pipettes to β_2m , CysC, TTR or CRP to rapidly monitor for biological fluid level modulation and to potentially quantify a modulated protein event from their normalized relative abundance. This figure

WO 02/082051

PCT/US02/01541

illustrates another of the uses of affinity pipettes for monitoring potential β_2m /CysC levels in acute phase of viral infection (e.g. AIDS) or fibril formation from β_2m or TTR.

Fig. 21 Mass spectrometry target arrays. (A) Plateau target capable of confining sample through meniscus action. (B) Contrast design capable of confining sample through hydrophobic/hydrophilic action. (C) Insert targets for use with smaller sampling loads, expensive reagents, or sample transfers.

DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

The present invention provides an integrated high throughput system capable of selectively retrieving and concentrating specific biomolecules from biological media for subsequent high-performance analyses, such as identification of biomolecules, quantifying targeted biomolecules, recognizing variants of targeted biomolecules (e.g., splice variants, point mutations and post-translational modifications) and elucidating their nature, such as analyzing for, and identifying, ligands interacting with the targeted biomolecules, and high-throughput screening of large populations of samples using a single, unified, economical, multiplexed and parallel processing platform.

The preferred embodiment of the integrated system comprises molecular traps, such as affinity microcolumns, processing stations, and derivatized mass spectrometer target arrays, which may be omitted in non-preferred embodiments, that work with mass spectrometers capable of single or multi-sample input and using processing/data analysis interactive databases. The present invention also includes methods and processes for use of the individual components and the integrated system in biological applications. Furthermore, the preferred embodiment of the present invention provides for the preparation and/or processing of multiple separate devices and/or samples to accomplish high throughput analysis.

A major component of the system of the present invention is the isolation or retrieval of specific analytes from their surrounding biological media in a biological sample. This is accomplished using a molecular trap. In a preferred embodiment of the molecular trap, the retrieval process entails repetitively flowing the biological sample through devices that have affinity receptors located on surfaces with a high surface area content. The affinity receptors are selected to capture specific analytes.

WO 02/082051

PCT/US02/01541

In the high throughput embodiment, these molecular traps are formed into miniature columns, affinity microcolumns, thereby allowing numerous molecular traps to be located side-by-side and taking up minimal amount of physical volume. In a preferred form of the side-by-side embodiment, the numerous molecular traps are contained within a unitary component, such as a manifold or block of material. In this form the manifold contains numerous microchannels that house the molecular traps.

The molecular trapping process is accomplished by allowing sufficient physical contact between the affinity receptors located on the molecular traps and the analyte contained in the biological sample. The affinity receptors capture, or isolate, the specific analytes using an affinity interaction between the affinity receptors and the specific analytes. After the specific analytes are captured, residual or non-captured compounds are washed free of the molecular traps using a series of rinses. The capture and rinse processes result in the concentrating of the specific analytes into the low dead-volume of the affinity microcolumns.

After the specific analytes have been captured, they are eluted from the molecular traps using a small volume of a reagent capable of disrupting the affinity interaction. The eluted specific analytes are then stamped directly onto a mass spectrometry target platform for either mass spectrometry or for further processing, e.g., enzymatic/chemical modification via utilization of bioactive MS target arrays, followed by subsequent preparation for mass spectrometry. Automated mass spectrometry then follows with either the specific analyte or modified fragments detected with high precision. Software capable of recognizing differences between samples, or from a standard, is used to aid in the analysis and organization into database of the large numbers of samples. Alternately, instead of stamping the eluted specific analytes onto a mass spectrometry target, the specific analytes may be eluted directly into an electrospray ionization mass spectrometer by using the molecular traps as a component in the sample introduction device, such as the needle of an electrospray mass spectrometer.

The high throughput embodiment of the present invention uses robotics for serial preparation and parallel processing of a large number of samples. The use of microcolumns in capturing the specific analytes enables an arrayed format, as

WO 02/082051

PCT/US02/01541

mentioned above, that is ideal for such high-throughput processing since it minimizes the physical volume and/or area occupied by the microcolumn array. Use of affinity microcolumns with appropriately configured robotics allows multiple samples to be prepared, processed, start-to-finish, simultaneously on a unified platform thereby enabling high throughput of samples. Specifically, all capture, separation and elution steps are performed within the microcolumns managed by the robotics system or systems. This is in contrast to the use of other affinity capture methods (using, e.g., beaded media) where mechanical/physical means (e.g., centrifugation, magnetic or vacuum separation) are used to separate the specific analyte from the biological fluid and rinse buffers. Oftentimes this physical separation needs to be performed singularly, resulting in the disruption of a parallel processing sequence, as well as the ordering of the array. Because these mechanical/physical means are not necessary when using the microcolumns, parallel-processing sequences can be used without disruption and the integrity of an ordered spatial array is maintained throughout the entire process. Most conveniently, multiple preparations/analyses are performed serially and in parallel using robotics fitted to commonly used spatial arrays, e.g., 4-, 8-, 16-, 48-, 96-, 384 or 1536 well micro-titer plate formats.

INDIVIDUAL COMPONENTS

SAMPLE MODIFICATION/PREPARATION

In all of the below described embodiments, it may be desired that the biological media or the target analyte be modified or prepared either prior to affinity action or after affinity capture, but before elution onto a target or target array. Example modifications or preparations include, but are not limited to, reduction, labeling or tagging, in situ digests, partial on-surface digestion/modification, pH adjustments, and the like.

MOLECULAR TRAPS

In one embodiment of the invention, molecular traps are microcolumnar devices that have bound affinity receptors. The molecular trap is chemically modified, such as by treatment with an amino-silane reagent and subsequently activated for affinity receptor linkage using any one of a number of derivatization schemes. The use of affinity microcolumns overcomes the disadvantages entailed in performing affinity capture by other means. Specifically, affinity microcolumns, as

WO #2002051

PCT/US01/01541

described herein, are scaled to mass spectrometric analyses that have only become available in the last ten years. Prior to the advent of MALDI-TOF and ESI mass spectrometry, mass spectrometric analyses of polypeptides (if they could be performed at all) required amounts of analyte on the order of nanomoles, which, if isolated via affinity capture, required milliliter volumes of reagent containing bound receptors and, oftentimes, liter volumes of biological media. Given the low- to sub-femtomole sensitivities of MALDI-TOF and ESI mass spectrometry, the entire affinity isolation processes, including devices, can be scaled down by several orders of magnitude. Therefore, the affinity microcolumns described herein are devised and manufactured to fully utilize the sensitivity specifications of the recent enabling mass spectrometric techniques.

An additional embodiment of the present invention is to provide a variety of affinity microcolumns specifically tailored to excel in a given biological media, illustrated in Fig. 6. Because all biological media are not exactly the same, with regard to biomolecule compositions and conditions, each affinity reagent derivatization scheme will behave differently in each biological media. For instance, affinity reagents tailored to retrieve a specific protein analyte present in plasma may not behave ideally when targeting the same analyte when present in a different biological media. Furthermore, the different buffer compositions and conditions of each biological media make available numerous small organic compounds that when retained and subsequently eluted with the targeted analyte will potentially detract from the mass spectrometric process. It is therefore necessary to construct affinity microcolumns for each biological fluid that show not only high specificity towards targeted analytes and low non-specific binding properties with regard to other large molecules that potentially interfere with the characterization of the analyte, but also exhibit minimal retention of smaller molecules that potentially interfere with the physical phenomena underlying mass spectrometric processes, e.g., MALDI or ESI.

TARGETS

After analytes are retrieved from biological media they are essentially microeluted and "stamped" directly from the affinity microcolumns onto a target or target array fitting into a mass spectrometer. In this manner, the spatial array from the

WO 02/082051

PCT/US02/01541

initial multi-sample container, e.g., titer plate, is maintained throughout the affinity capture and washing steps, as well as onto the mass spectrometer target.

The present invention further embodies the use of specially tailored mass spectrometer targets in the automated preparation and analysis of proteins retrieved using the affinity microcolumns. Essential to incorporating the automated robotics into the high throughput, parallel process is reproducibility between each sample, and the ability to control the location of the samples upon deposition onto the mass spectrometer target. In order to ensure these aspects are instilled into the automated process, self-assembled monolayers (SAM) are patterned onto mass spectrometer targets in manners able to control the area of analyte deposition. For example, thiol or mercaptan compounds that are hydrophobic or hydrophilic in character are used to pattern contrasting areas on gold-plated targets. By surrounding a hydrophilic SAM with a hydrophobic SAM, a clear boundary is created that is able to confine aqueous sample (from the affinity microcolumns) to a clearly defined area on the target. The spatial array dictated by the parallel robotics can thus be maintained by simultaneously cluing multiple samples, from multiple affinity microcolumns (using robotics), onto a mass spectrometer target patterned to the same spatial array used in throughout the robotic processing.

In other applications, mass spectrometer targets are additionally tailored to include reactive surfaces capable of analyte processing. When investigating biomolecules using mass spectrometry it is often necessary to perform telltale chemistries and/or enzymologies to gain further detail on the structure of an analyte. Of particular importance are analytes that use specific chemical or enzymatic modifications in combination with mass spectrometry for purposes such as identifying analytes, analyte variants and modifications present within an analyte. Moreover, oftentimes it is of great value to quasi-purify mass spectrometric preparations by removal of potentially interfering species from solution through scavenging interactions designed to remove the interferences while leaving the target analyte available of analysis. A most efficient means of performing these operations is to use mass spectrometer targets that are derivatized with chemicals or enzymes for the particular processing function.

WO 02/082051

PCT/US02/01541

In a preferred embodiment, a target or target array is made by first etching channels around designated target areas using photomask technologies. A layer of gold is deposited onto the etched substrate, such as by traditional electro-plating techniques or plasma deposition. This layer of gold naturally follows the surface contours created by the etching. Depending upon the substrate, one or more intermediate layers may be required, such as a nickel intermediate layer is required when depositing a surface layer of gold. An activated or activatable reagent, capable of forming a chemical bond or adsorbing to the modified substrate surface, such as dithiobis(succinimidylpropionate) (DSP) or derivatives thereof, is then bound onto the target areas, but not elsewhere. Any transport solvent is either allowed to evaporate or removed producing a dry self-assembled monolayer (SAM) of the activated or activatable reagent. A protective layer is deposited onto the target SAM, such as dextran solubilized in appropriate solvent. When that solvent is DMSO, the DMSO is then removed by placing the target in a vacuum. The target (array) is then coated with a hydrophobic reagent, such as octadecyl mercaptan solubilized in a solvent that does not dissolve the protective layer. When dextran is the protective layer, isopropanol may be used to solubilize the hydrophobic reagent. The target is rinsed to remove any non-bound hydrophobic reagent. In the example where activated reagent is bound to the target areas, the activated reagent is made available for use by merely removing the protective layer, which also removes any hydrophobic reagent present in or on the protective layer, such as by rinsing with DMSO. In the example where activatable reagent is bound to the target areas, the reagent may be activated for use by either removing the protective layer followed by reagent activation using an activating reagent or by direct activation, where the solvent transporting the activating reagent also serves to dissolve the protective layer. In the second case, the dissolved protective layer is then removed by subsequent rinses. Finally, a bioreagent or biological reagent, such as a polymer, protein, peptide, or enzyme, is bound to the surface of the target areas. The binding of the bioreagent is facilitated by the activated reagent already bound to the target areas. In the case where there is activated reagent coated by the protective layer, the bioreagent may be added to the surface by either removing the protective layer and then adding

WO 02/082051

PCT/US02/01541

bioreagent to the target area or by direct binding, where the solvent transporting the bioreagent also serves to dissolve the protective layer.

An advantage to the above target or target array manufacturing process is that the targets, once coated with the protective layer, may be stored for extended periods of time and then used at the discretion of the consumer. Another advantage of the target array is to provide a confined reaction surface for analyte processing and manipulation of impurities.

In yet another similar embodiment, mass spectrometer target surface or surfaces are derivatized with chemicals found to enhance sample preparation through promoting the formation of crystals of matrices used in the practice of MALDI. Such matrix crystal "seeding" is found invaluable in the automation of the entire sample preparation process, enabling the production of highly reproducible samples over the entire area of the target.

HIGH THROUGHPUT MACHINE

The individual components described herein come together to form a single, integrated system capable of high-throughput analysis of analytes retrieved from biological media. Fundamental analyses begin with verifying the primary structure, i.e., sequence of analytes. Oftentimes, a single high-accuracy determination of molecular weight is sufficient to verify the primary structure of analytes. If higher precision is required in verifying the primary structure of an analyte, it is convenient to mass map the analyte (after retrieval) using chemically/enzymatically active mass spectrometer targets. During such mapping procedures, an analyte is digested using high specificity cleavage reagents to produce a multitude of signals when analyzed using mass spectrometry. When viewed as a group, these signals are able to verify primary structure with greater precision and redundancy than a single mass determination. Alternatively, these data can be used to search databases for variants of an analyte that differ largely from that predicted for a normal analyte, e.g., splice variants.

In a similar embodiment, other variants of analytes are mapped to elucidate the nature, location and origin of the variation. Analytes and variants present in a single sample are co-extracted from biological media using a common affinity reagent localized in the microcolumn and are simultaneously subjected to mapping on an

WO 02/082051

PCT/US02/01541

activated mass spectrometer target or target array. Because most analyte variants will share a large degree of homology with the normal analyte, most mapping signals will be common between the analyte and variant. However, uncommon, or mass-shifted, signals will also be present within the mapping data. Using these differential data, in combination with knowledge of the cleavage agent and information of the primary, tertiary, quaternary structures of the normal analyte, it is possible to elucidate the site of the variation. Furthermore, using knowledge of mass differences between component residues of the analyte (e.g., mass difference between amino acids in proteins or nucleic acids in DNA/RNA) and accurate determination of the mass-shifts, it is possible to determine the transposition that created the variant. Such analyses are of great value in elucidating, e.g., point mutations present in proteins or polymorphisms present in nucleic acids. Likewise, knowledge of molecular weights of potential modifying groups (e.g., glycans, phosphates, methyl, fatty acid and the like) can be used in combination with mapping data to elucidate the sites and nature of chemical modifications of the analyte. Finally, reactive targets designed to address specific modifications can be used in the integrated system for the determination of the quantity (number) of modifying moieties by cleaving them from the analyte and viewing subsequent mass shifts in mass spectra.

In another embodiment, the present invention is used in the high-throughput quantitation of specific analytes present in biological media. Using this process, analytes and internal references (analyte-like species) are simultaneously retrieved from biological media and processed through to mass spectrometry. In the same parallel processing operation, standard samples are analyzed to produce working curves equating analyte signal with the amount of analyte present in the biological media. The amount of analyte present in each sample can then be either judged as elevated relative to other samples, or determined absolutely using the working curve.

In a further embodiment, the present invention is used in determining the interacting partners involved in protein-ligand interactions. Essentially, affinity microcolumns are derivatized with ligands of interest with the intention of screening biological media for interacting partners. The ligands act as affinity receptors capable of selectively isolating analytes from the biological media. Once isolated, the analytes are subjected to mass spectrometry for identification. Oftentimes, direct mass

WO 02/082051

PCT/US02/01541

spectrometric analysis, and a knowledge of components present in the biological media, is sufficient to identify retained analytes via direct molecular weight determination. Alternatively, unknown analytes are subjected to digestion using chemically/enzymatically active targets and the resulting fragments (e.g., proteolytic fragments) subjected to mass spectrometry. The accurately determined molecular weights of the fragments (and knowledge of cleavage specificity) are then used to find genomic or protein database searches capable of identifying the analytes.

In a similar embodiment, protein-ligand interactions are investigated by designing an affinity reagent to target a specific protein that in itself retains other analytes. In this manner, protein complexes are retrieved from biological media by targeting one of their constituents. Using the aforementioned analytical approaches, the identity and nature of the components of the complex are then delineated.

Specific embodiments in accordance with the present inventions will now be described in detail. These examples are intended to be illustrative, and the invention is not limited to the materials, methods or apparatus set forth in these embodiments.

EXAMPLES

Affinity Microcolumn Manufacture

Below are described the directed formation of the preferred embodiments of biologically sensitive affinity-ligated microcolumns capable of high throughput via efficient affinity capture, release and rapid, sensitive and accurate mass spectrometric analysis of specific or non-specifically targeted analytes. The below examples describe numerous approaches, architectures and device deliveries to provide stable configurations in biological rich environments.

EXAMPLE 1

Porous glass molecular trap preparation using metal mold-graphite spray release

Porous glass molecular traps are metered to the specifications of commercially available wide-bore P-200 pipettor tips using annealing molds made of stainless steel (100-1000 holes of 0.071 inch (entrance) per mold; 2-degree taper, polished and treated with graphite release agent). The molds are loaded with soda lime glass spherical beads (150-200 μ m; 75% SiO₂, 15% Na₂O and 10% CaO), and annealing is achieved in an argon-backfilled furnace by ramping the temperature from 772°C (equilibrated, t=0) to 800°C (t=3 minutes; one-minute equilibration). Upon

WO 02/082051

PCT/US02/01541

completion of the ramp-up, the molds are immediately removed from the oven and the porous glass molecular traps extracted from the molds. This process typically yields porous glass molecular traps with high-flow characteristics and appropriate bore and taper to fit the entrance of the wide-bore P-200 pipette tips (room temperature porous glass molecular traps dimensions: 0.061 in. (entrance), 0.092 in. (length), 2-degree taper).

In a preferred embodiment, the molecular traps are then inserted into the top of the pipette tip and allowed to locate to the bottom section (narrow section). The molecular traps are seated by the application of a sufficient amount of pressure applied from the top. The pipette tip may be heated prior insertion of the molecular trap to aid in the seating process.

Sample mass spectra using an affinity microcolumn prepared according to this example are illustrated in Figure 2-5.

EXAMPLE 2

Porous glass molecular trap manufacture using ceramic molds - Pyrex

Ceramic molds are described to manufacture porous Pyrex glass molecular traps. Porous glass molecular traps are metered to the specifications of commercially available wide-bore P-200 pipette tips using ceramic annealing molds. Zircar type-R plates (four by six by one-quarter inches) were purchased from Zircar Corporation (Florida, NY) and were end-mill surfaced for maximum flatness and CNC machined (2100 holes, 0.0625 inch bottom cut, 2-degree taper). Four of the ceramic molds loaded with ball-milled powdered borosilicate "Pyrex" (size ranging from 4 μ m to 300 μ m; 81% SiO₂, 4% Na₂O, 0.5% K₂O, 13% B₂O₃ and 2% Al₂O₃), were stacked in a furnace where they underwent initial temperature equilibration, using a slow temperature up-ramp (60 minutes) to below the Pyrex softening point (816°C). The molds were then equilibrated for thirty minutes prior to being ramped to about the Pyrex softening point (821°C), which was then maintained for about thirty minutes to form porous glass molecular traps. For concerted heat treatment (using enhanced silica glass); the molds were down-ramped to 708°C where they were maintained for 2 to 20 hours (depending on the amount of etching desired) prior to a slow final temperature ramp down for removal. When immediate use is required, the molds are slowly temperature down-ramped to a reasonable retrieval temperature (generally

WO 02/082051

PCT/US01/01541

300°C) to avoid glass cracking. This process typically yields porous Pyrex glass molecular traps with high-flow characteristics and appropriate bore and taper to fit the entrance of the wide-bore P-200 pipette tips (room temperature porous glass molecular traps dimensions: 0.0625 in. (entrance), 0.130 in. (length), 2-degree taper).

EXAMPLE 3

Porous silica glass molecular trap manufacture using ceramic molds - Vycor

The ceramic molds described in EXAMPLE 2 are used to manufacture porous Vycor glass molecular traps. Zircar type-R ceramic molds were loaded with powdered "Vycor" (Corning Corporation), porous Vycor (Corning Corporation), controlled porous glass (Controlled Porous Glass, Inc., NJ), (size ranging from 4 μm to 300 μm , depending upon desired flow-through characteristics; 96% SiO_2), and were stacked in a furnace where they underwent initial temperature equilibration, using a slow temperature up-ramp (90 minutes) to below the Vycor softening point (1500°C), they are then equilibrated for thirty minutes prior to being ramped up to about the Vycor softening point (1530°C), which was maintained to form porous glass molecular traps. The molds were slowly temperature down-ramped to a reasonable retrieval temperature (generally about 300°C) to avoid glass cracking. This process typically yields porous Vycor glass molecular traps with high-flow characteristics and appropriate bore and taper to fit the entrance of the wide-bore P-200 pipette tips.

EXAMPLE 4

Porous silica molecular trap manufacture using ceramic molds - silica gel or fused silica

The ceramic molds described in EXAMPLE 2 are used to manufacture porous glass molecular traps using silica gel or fused silica. Zircar type-R ceramic molds were loaded with powdered porous silica gel (Sigma Chemical Company) or fused silica (Corning Corporation) (sizes ranging from 4 μm to 300 μm depending upon desired flow-through characteristics; 100% SiO_2), and were stacked in a furnace where they underwent initial temperature equilibration, using a slow temperature up-ramp (90 minutes) to below the silica softening point (1550°C) where they are equilibrated for thirty minutes prior to being ramped to about the silica softening point (1585°C), which is then maintained to form porous silica molecular traps. The molds were slowly temperature down-ramped to a reasonable retrieval temperature

WO 02/082051

PCT/US02/01541

(generally about 300°C) to avoid silica cracking. This process typically yields porous silica molecular traps with high-flow characteristics and appropriate bore and taper to fit the entrance of the wide-bore P-200 pipette tips.

EXAMPLE 5

Etched Porous silica molecular traps

Hyper-porous porous silica molecular traps formation is accomplished by exposing porous silica molecular traps formed in Example 4 to various electrochemical etching conditions. For example, porous silica molecular traps are placed in a solution of aqueous HF (25-50%) in absolute ethanol while applying an etching current (120-200 mA/cm²) and irradiation (150 mW/cm²) for one to twenty minutes thereby creating porous silicon hydride surfaces.

EXAMPLE 6

Porous powdered metal molecular trap manufacture using metal mold

Porous metal molecular traps are mastered to the specifications of commercially available wide-bore P-200 pipette tips. A metal mold is machined, having either a reverse incline (relative to the previous molds, i.e., narrow at the top) or the same directional taper, and containing a slight raised lip (for required overfill) around the openings located at the bottom of the mold (for porous powdered metal exit by a pushpin). The mold rests upon a removable bottom plate, is loaded with powdered metal (e.g., brass, copper, silver, gold), and pressure (commensurate to form individual welds between metal particles) is applied to the throated/narrowed powdered metal surface via an Arbor press equipped with a complementary pushpin for each hole. After the powdered metal molecular traps are formed, the bottom plate is removed, and a pushpin is applied to the narrow end of the hole to release the porous powdered metal molecular trap from the mold. Porous powdered metal molecular traps are oven annealed to enhance architectural stability and form metal oxides for organo-functionalization.

It should be recognized that the molecular traps may be made from a variety of different materials and or different combinations of different materials and still fall within the scope of the present invention. The only limiting requirement is that the materials must be able to bind affinity reagents, or chemically modified to bind affinity reagents, to their surfaces. The most preferred materials or combinations of

WO 02/082051

PCT/US02/01541

materials have high surface areas or are capable of being modified to have high surface areas.

While the above examples utilize a tapered profile for the microcolumns, non-tapered or shapes, such as cylindrical columns, may be used and still fall within the scope of the present invention. In deed, for high throughput embodiments, the non-tapered form is preferred since the taper slows the manufacturing process.

Chemical Activation of the Molecular Traps

EXAMPLE 7

Silane coating/functionalization of porous glass molecular traps

10 Porous molecular traps formed via EXAMPLES 1-6, or other equivalent processes, may undergo pretreatment conditioning combining various water, mineral acid treatments, and concomitant water rinses and drying prior to chemical derivatization (silanization). For example, porous glass molecular traps are leached by suspending them in distilled or purified water (generally ten fold by volume) under
15 elevated temperatures (typically below the boiling point of water) with orbital shaking for 1 to 24 hours, with (or without) two to three change outs of fresh water. All water is then removed and two subsequent acid treatments applied. First, 1N hydrochloric acid in water is applied (ten fold) over the porous glass molecular traps, at elevated temperatures a time, such as one to two hours, and water rinsed until a neutral (or
20 near neutral) pH is obtained. Second, 1N nitric acid in water is carried out as performed with the first acid treatment. The porous glass molecular traps are dried either at room temperature or in a vacuum oven (100°C, 1 atm, overnight).

The dried/pretreated porous glass molecular traps are then chemically activated, such as by coating them with a silanating reagent, e.g. 10% silanating agent, ca. N-[3-(trimethoxysilyl)propyl]diethylenediamine, in anhydrous toluene under
25 reflux with orbital shaking overnight, to produce functionalized porous molecular traps. The silane coated porous molecular traps are allowed to cool to room temperature, rinsed in methanol under reflux, followed by room temperature rinses, until the supernatant is negative to ninhydrin and/or trinitrobenzoic acid (tnba)
30 analysis. Other, useful silanating reagents include, but are not limited to, 3-(trimethoxysilyl)propyl acrylate, 3-(trimethoxysilyl)propyl amine, N-[3-(trimethoxysilyl)propyl] aniline, N1-[3-(trimethoxysilyl)propyl]diethylenetriamine, N-

WO 02/082051

PCT/US02/01541

[3-(trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine, 3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate, [3-(trimethoxysilyl)propyl]octadecyldimethylammonium chloride, N-[3-(trimethoxysilyl)propyl]polyethylenimine, N1-[3-(trimethoxysilyl)propyl]carboxylic acid, aminopropyltriethoxysilane, 3-glycidypropyltrimethoxysilane,

thiopropyltrimethoxysilane, chloropropyltrimethoxysilane, octadecyltrimethoxysilane, octadecyltrichlorosilane, U-[2-(trimethoxysilyl)ethyl]O-methylpolyethylene glycol, silyl aldehyde, and the like.

These reactions may be accelerated by base catalysis, such as using triethylamine (TEA) added to the reactions or by performing them under pressure by applied vacuum (ca. 1 atm).

Microcolumn Housing (Pipette) Manufacture

In the preferred embodiment, where non-tapered molecular traps are used, micro-pipettes, which are used as the microcolumn housing are modified as follows:

Microcolumn housings, such as micropipette tips are formed, such as by injection molding or other means well known in the arts. The distal end of the housings are modified from ordinary micropipettes by providing at least one inset projection, such as a ledge. In one embodiment, the projection is a continuous ledge that following the inner diameter of the distal end of the housing. However, in a more preferred embodiment the at least one inset projection is a single tang or triangular projection, more preferably, three tangs, and even more preferably six tangs. Thus, when the molecular traps are loaded into the housing, each rests upon the at least one inset projection. After the molecular traps are loaded into the housings, a portion of the sides of the housing directly adjacent to the molecular traps are crimped inward to a degree where there is slight frictional contact with the molecular traps. Care must be taken not to over crimp since that would destroy the contained molecular traps. In a preferred embodiment, the crimping is accomplished by heating the outer surface of the housing while cooling the contained molecular trap with a flow of cool gas (an inert gas is preferred). The heated housing is then forced inward using a gradual taper in the heating mold, thereby crimping the housing to the molecular traps.

Batch Functionality

EXAMPLE 8

WO 02/082051

PCT/US02/01541

Batch direct activation/derivatization of functionalized porous molecular traps

Direct batch activation/derivatization of microcolumns targets any reactive chemical group that will couple to the representative affinity ligand and provide an environmentally stable linkage. Batch activation/derivatization approaches proceed in a myriad of ways, targeting activation/conjugation chemistries for biological modification with either organic and inorganic reagents, for example: primary amines, carboxylic acids, thiol groups, sulfhydryls hydroxyls, allyl groups, oxides, aldehydes, hydrazides, maleimides, triazines and the like, that can be activated with homobifunctional, heterobifunctional or polymeric reagents.

The instant example illustrates one of these approaches by incorporating glutaraldehyde activation followed by ligand coupling through primary amine groups with aldehyde groups on the glutaraldehyde-porous molecular trap. First, amine functionalized molecular traps are coupled to glutaraldehyde (a 25% solution in 0.10 M sodium phosphate, pH 7.8, 100 mM NaCl buffer) using sodium cyanoborohydride (10 mg/mL) mediated coupling (reaction times ranging from an hour to overnight). After several rinses with the phosphate buffer, the activated aldehyde groups on the glutaraldehyde matrix are incubated with the ligand of interest, such as a protein antibody. Uncoupled (excess) ligand is removed by extensive rinsing with HBS buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.005% Surfactant P20). This derivatization process yields molecular traps with a high analyte binding capacity. The molecular traps are then packed into the P-200 pipettor tips.

EXAMPLE 9

Batch amine activation, amplification, reactivation and derivatization of functionalized porous molecular traps

amine-CHO-poly-amine-CHO-Ab

Microcolumn activation with amplification allows another approach for addressable ligand coupling. To create an amplified amine surface, mild to high-molecular weight amine-polymers, such as polylysine, aminodextran or amine modified starburst dendrimers, are cross-linked to the functionalized/activated porous molecular traps surface through a variety of appropriate chemistries. A glutaraldehyde activated amine microcolumn is incubated with polylysine in a sodium

WO 02/082051

PCT/US01/01541

cyanoborohydrate mediated coupling. This polyamine microcolumn is then re-activated using glutaraldehyde, water rinsed and protein ligand conjugated.

EXAMPLE 10

*Damping of nonspecific binding via batch surface amine modification
activation/derivatization of functionalized porous molecular traps*

amine—>CHO—>poly-amine—>NHS/EDC—>polyCOOH—>NHS/EDC—
>LIGAND

Another approach to ligand immobilization is through coupling of ligand-borne carboxyl groups to surface amines. An opportune way of creating an amplified amine surface is through cross-linking high-molecular weight polylysine, aminodextran, amine modified starburst dendrimer or polyacrylylhydrazide to the functionalized porous molecular traps surface followed by distal carboxyl generation through a variety of chemistries, such as EDC-mediated linkage of carboxyl-terminated cross-linkers (e.g. succinic or glutaric anhydride) or bisoxirane activation (resulting in an epoxide-activated surface). These carboxyl microcolumns are then used to immobilize low-pI protein ligands via ca., EDC/NHS-mediated activation/coupling. Specifically, polylysine microcolumns are incubated in bulk in succinic (or glutaric) anhydride (100 mg/mL anhydride in 0.2M sodium acetate pH 4-5) with the reaction allowed to proceed to completion (i.e., negative tabs and ninhydrin amine testing) generally for two to four hours, while pH is maintained by dilute hydrochloric acid addition. The carboxy microcolumns are then activated with 100 mM NHS and 100 mM EDC in water for 10-20 minutes at room temperature, water rinsed and a slight vacuum is applied prior to protein ligand coupling (antibody 1-10 mg/mL HBS buffer pH 7.5, overnight 4°C, shaker).

EXAMPLE 11

Batch polymer modified carboxylic acid activation/derivatization of functionalized porous molecular traps

Another approach involves surface amplification with water-soluble carboxyl containing polymers (carboxymethyl dextran, carboxymethyl agarose, carboxymethyl cellulose, carboxymethylamylose, polyglutamic acid, polyacrylic acids, carboxyl modified starburst dendrimers) like carboxymethyl dextran, followed by coupling of ligands, such as via interaction of primary amine groups with the

WO 02/082051

PCT/US02/01541

carboxyl groups on the dextran matrix. First, the amine functionalized microcolumns are coupled to 15 kDa carboxymethyl dextran (CMD) executed in 100 mM sodium phosphate, pH 4.8, 100 mM NaCl buffer, via EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide) mediated coupling. After several rinses with the phosphate buffer, the carboxyl groups on the dextran matrix are activated with a mixture of EDC/N-hydroxy succinimide (NHS; 100 mM each, in H₂O) and incubated with the ligand of interest, such as a protein antibody. Uncoupled (excess) antibody is removed by extensive rinsing with HBS buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.005% Surfactant P20), after which the molecular traps are packed into the P-200 pipettor tips. This derivatization process yields microcolumns with a higher binding capacity, compared to microcolumns for which no amplification layer (the CMD matrix) is used. Although the initial amino-silication activation step results in amine surfaces (de facto a "functional surface"), it is preferred to amplify the surface in order to increase distance off the binding surface, loading capacity, and ensure a uniform (homogeneous) surface coating throughout the entire microcolumn (thereby reducing potential interactions that may occur with the glass substrate and result in non-specific binding).

EXAMPLE 12

Batch carboxymethyl dextran carbonyldiimidazole (CDI) activation/derivatization of functionalized porous molecular traps

In yet another approach to ligand immobilization, the EDC/NHS activation procedure of the CMD layer is replaced by an activation with *N,N'*-carbonyl diimidazole (CDI). This activation results in carboxyl and hydroxyl groups present in the CMD being converted to an imidezoyl carbamate intermediate capable of reacting with primary amines or thiols present in the affinity ligands. For instance, CMD microcolumns are rinsed with acetone followed by dimethylsulfoxide (DMSO). A 100 mg/mL solution of CDI in DMSO is then overlain above the CMD microcolumns, a vacuum applied, and the activation allowed to proceed from two hours to overnight on an orbital shaker. The CDI activated affinity pipettes are extensively rinsed in DMSO followed by acetone to form a CDI-activated CMD microcolumn. Importantly, the CDI-activated media is known to be reasonably stable, with shelf lives on the order of months given proper storage conditions (i.e., (wet) isopropanol

WO 02/082051

PCT/US02/01541

or (dry) inert gas or vacuum). Thus, the CDI can act as a stable activator of the microcolumns and increase the longevity for pre-activated supply. Alternatively, the CDI-activated matrix is incubated with the protein antibody of interest. Uncoupled (excess) antibody is removed by extensive rinsing with HBS buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.005% Surfactant P20), after which the molecular traps are

EXAMPLE 13

Batch in-situ polymerization or co-polymerization via surface polymerization of organo-functionalized porous glass molecular trap

In this example, organo-functionalized porous glass molecular traps (c.a., methacryltrimethoxysilimated) are *in-situ* polymerized via free radical initiation. Typical co-polymerization monomers used include but are not limited to allyl dextran, allylamine allyl glycidyl ether, acrylic acid, and vinylidimethyl azlactones which can incorporate cross-linking agents, such as methylene-bis(acrylamine), using typical initiating reagents such as tetramethylethylenediamine (TEMED) or N,N,N',N'-tetramethyl-1,2-diaminoethane and ammonium persulfate in water. The degree of cross-linking and polymer size is controlled by amount of initiator, polymerization time, and available comonomers for termination. This surface reaction results in functional groups abounding within the polymeric matrix, which covers the molecular trap surface. These groups are then available for activation/conjugation to ligands or subjected to additional activation and amplification prior to activation and ligand coupling.

EXAMPLE 14

Metal chelator modified porous glass molecular traps

The incorporation of metal chelators into porous glass molecular trap is useful for metal binding biomolecule retrieval. Amine or polyamine microcolumns, prepared as in previous examples, are overcoat in 0.1M phosphate at pH 7 and evacuated using a rotary evaporator. Primary amine surfaces are then directly coupled to bifunctional chelating agents such as ethylenediaminetetraacetic dianhydride (EDTA-DA), and diethylenetriaminopentaacetic dianhydride (DTPA-DA) at 20-100 mg/mL to form metal-chelating arms (TED and EDTA respectively) able to bind tightly metals in a coordination complex for biomolecule trapping.

WO 02/082051

PCT/US02/01541

Alternatively, metal-chelators such as ethylenediaminetetraacetic acid (EDTPA), 1,4,7,10-tetracyclononane-N,N',N'',N'''-triacetic acid (NOTA), 1,4,7,10-tetracyclododecane-N,N',N'',N'''-tetracetic acid (DOTA), 1,4,8,11-tetracyclotetradecane-N,N',N'',N'''-tetracetic acid (TETA), 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N',N'' tetraacetic acid (BAPTA), N,N(bis(carboxymethyl) L-lysine are solution activated using for instance NHS/EDC (100 mM each, 0.1 M phosphata, pH 7) mediation to couple carboxyl groups to localized surface primary amines.

EXAMPLE 15

10 *Formation of biomimic ligands, preparation of batch dye-functionalized porous glass molecular traps*

Synthetic dyes are useful affinity ligands by virtue of their reactivity with a wide variety of biological materials. Reactive dyes encompassing but not limited to triazine dyes (i.e., reactive black, reactive blues, reactive browns, reactive greens, 15 reactive oranges, reactive reds, reactive yellows, etc.), for instance, have been linked to amino-microcolumns using a simple approach. The triazine dye of interest, ca. Cibacron Blue at 50 mg/mL dissolved in distilled water, is added to amino microcolumns in a round bottom flask and allowed to react overnight under low reflux. After ligand coupling, the biomimic microcolumns are rinsed with water and 20 incubated with 1N salt solution under low reflux for thirty minutes. After extensive water rinses, the biomimic microcolumns are dried either in air or under vacuum at 90°C.

EXAMPLE 16

Formation of ion exchange-functionalized porous glass molecular traps in batch

25 The incorporation of ion exchange media into porous glass molecular trap is useful for bio-molecule binding, retrieval and analysis or in sample cleanup as in desalting surfactant (SDS removal). In this instance, the amino or polyamine microcolumns, are activated targeting for example carbohydrates hydroxyl groups contained within dextran ion exchange media (e.g., dextran-sulfate, diethylaminoethyl- 30 dextran (DEAE-dextran), heparin-sulfate, carboxymethyl dextran (generation described previously in EXAMPLE 10). Primary amine surfaces are activated with bifunctional (or activating) agents such as triazine, diglycidylether (oxiramines or

WO 02/082051

PCT/US02/01541

epoxides) prior to dextran ion exchange carrier coupling. Likewise epoxide-functionalized microcolumns generated from initial silylation reactions or via copolymerization are used for derivatization.

Alternatively, amine microcolumns are incubated/coupled to activated dextran carriers. A further example is the use of aldehyde groups on dextran carriers generated by sodium meta periodate oxidation of dextran (vicinal diols) ion exchange carriers. Specifically, dextran ion exchange media (10-100 mg/mL) is incubated in the dark in 1M sodium meta periodate (in water), for two hours after which, the oxidized dextran ion exchange media is either precipitated in organic (ethanol/ether) or dialyzed in water overnight. Oxidized dextran ion exchange media is then incubated with amine or polyamine microcolumns (0.1 M phosphate, pH 7.5).

EXAMPLE 17

Protein immobilization to microcolumns

Proteins with specific binding properties have specialized uses as receptors and ligands in immuno-chemistry. These affinity proteins include but are not limited to protein A, protein G, avidin and streptavidin reagents. Protein ligands, specifically protein A or G, are incorporated into porous glass molecular traps, for distal constant region (Fc) antibody capture or capture/conjugation with subsequent cross-linking prior to use as biomolecule retrieval agents. Avidin/biotin systems are used as alternative tethering agents which when coupled to antibody or analyte create conjugated agents with not only strong binding properties but with an amplified motif.

For example, amine or polyamine microcolumns, prepared as in previous examples, are overclean in 0.1M phosphate at pH 7 and evacuated using a rotary evaporator. Primary amine surfaces are then glutaraldehyde activated (25%, 4 to 24 hours), rinsed, and directly coupled to functional protein agents (or amine or hydrazide modified biotin) (1-10 mg/mL in HBS-EP) in a sodium cyanoborohydride (0.1 mg/mL) mediated coupling.

EXAMPLE 18

WO 02/082051

PCT/US02/01541

Protein modification/digestion using microcolumns

Biomolecules with specific modifying or digestion properties are used as receptors and ligands in biochemistry. These biomolecules include, but are not limited to, proteins, peptides, enzymes, catalytic antibodies, and the like.

5 For example, trypsin modified microcolumn is prepared as in previous examples. When activated, the trypsin will make specific digests at either arginine or lysine points in amino acid sequences of proteins, such as a targeted analyte protein.

Alternately, other receptors may be used to synergized two biomolecules into a single entity, such as phosphorylation of an analyte by immobilized kinase.

10 Target Manufacture

The current target designs used by the commercial manufactures do not adequately support the rigorous and consistent use of arrayed and/or bioactive targets. It is of great importance for these targets to achieve a high degree of intra-sample reproducibility.

15 There are at least three targets designs capable of correcting the problems encountered using the current design targets. These designs are as follows:

Targets utilizing plateaus

In a first embodiment of targets according to the present invention, there are "matched set" targets wherein a volume of analyte can be applied to a strictly defined area without the worry of spreading beyond the active area of the target. Volumes of analyte will meniscus on the top of a plateau formed by the target and, if correctly designed, will not seep down the sides of the plateau. Because of this meniscus action, the analyte will generally be in an aliquot volume of ~ 2-3 μL . This volume will fully cover the ~ 4 mm^2 area of the target completely, with little concern of overrunning the enzymatically-active area. Erratic digestion due to exposing the analyte to varying amounts of enzyme is therefore eliminated by fully covering (only) the active surface of the target. In addition, the ~ 2-3 μL volume will not evaporate if the targets are placed in an appropriately humidified incubator. Erratic digestion because of sample drying is therefore eliminated by maintaining the constant sample volume on the plateau.

30 In manufacture, there are plateaus milled into metal-base targets that fit into a larger (stainless steel) target that is ultimately introduced into the instrument. The

WO 02/082051

PCT/US02/01541

height of the plateaus is determined empirically, with the criterion of finding the minimum height necessary to avoid analyte spreading. A height of ~0.5 millimeter is usually adequate; a height that can be easily introduced into the acceleration region of all MALDI-TOF instruments (minimum clearance ~2 mm). The overall dimensions of the plateaus are such to adequately confine analyte without introducing instrumental artifacts into the analysis.

A second embodiment uses thin-gauge metal targets that fit into the instruments via a tongue-in-groove design. Because of the thin gauge of the targets, and the necessity of having a grooved mounting bracket, it is impractical to mill (machine) these targets. Therefore, a press method is used (pressing the targets from the backside) to create the plateaus. Note, the pressing method requires the machining of an appropriate die.

The appropriate base material is determined empirically for compatibility with solvents used during manufacture, gold-coating properties and vacuum compatibility. Initially, base targets are made of polystyrene, which is compatible with manufacturing solvents, can be sputter-coated with high uniformity and has low outgassing properties. However, other polymeric materials may be used. An advantage of the polymer-based targets is that they can be manufactured in large quantity at little expense.

The criteria for success with this type of target is to determine an optimum plateau geometry that: 1) adequately confines sample volumes to an exact surface area, 2) does not detract from the performance of the instrument, and 3) is easy and cost-effective to mass-produce.

Hydrophobic/hydrophilic contrast of targets or target arrays

A second embodiment design for high-reproducibility bioactive targets is to contrast enzymatically active sites with a hydrophobic media capable of confining the analytical volume to only the active area. In this approach, the enzyme is immobilized to gold/NSP/enzyme spots located on top of a generally hydrophobic target. The simplest way to manufacture the contrast devices is to construct them out of a hydrophobic material such as Teflon. Gold sample areas are placed on the target by a masking/sputter-coat process. The gold areas are then derivatized using our normal activation/immobilization methods. One concern regarding the Teflon device

WO 01/082051

PCT/US02/01541

is that of surface charging in the mass spectrometer. Such effects (charging of the sample stage by removal of ions) are always a concern in mass spectrometry design. MALDI-TOF analyses have been done from sample targets made of non-conducting materials (e.g., quartz targets or gels) with only minor effects due to sample charging.

5 These effects are even further minimized using the delayed-extraction methods available on all commercial MALDI-TOF instrumentation. However, any perturbations to mass spectrometer performance due to the targets may be eliminated by such methods as including electrical linking of the enzymatically-active surfaces in the masking/gold-coating process.

10 Another possibility for contrast devices is to derivatize metal-base targets to create a hydrophobic surface onto which hydrophilic enzymatically-active areas are constructed. Manufacturing protocols for this approach are more involved than the previous approach. It is necessary to follow a multi-step protocol to first coat the target with the hydrophobic media and then gold-coat a pattern of sample spots onto
15 the hydrophobic coat using a masking process. The process involves: 1) Sputter coating of entire targets with gold, 2) Activation with DSP (if necessary), 3) Immobilization of hydrophobic compound, 4) Re-sputter target using pattern mask, and 5) Activate fresh gold and immobilize enzymes. An example using this process is to gold-coat a target and derivatize with 1-octadecanethiol (skip DSP activation).
20 This process has been used to create C-18 derivatized surfaces. These surfaces are highly-hydrophobic as can be readily observed by beading of water. Once the target is derivatized with hydrophobic compound, a pattern of fresh gold is applied by masking and sputter-coating. The fresh gold is then activated and derivatized using e.g., the DSP/dextran/enzyme immobilization procedure. The process results in
25 hydrophilic, enzymatically-activated spots surrounded by a hydrophobic media. To enhance visual contrast between active and hydrophobic areas, hydrophobic dyes containing a single primary amine and no other chemically-reactive group (e.g., Fast Violet B, Methylene Violet 3RAX) can be used in place of the C-18 layer. Likewise, other classes of dyes or chromaphoric hydrophobic compounds can be used to create
30 more visual contrast between activated and hydrophobic areas of the targets. In preferred embodiment, hydrophilic mercaptoundecanoic acid dissolved in isopropanol is flash micro-deposited onto the arrayed targets, dried, and covered with octadecyl

WO 02/082051

PCT/US02/01541

mercaptan rapidly forming contrasted target arrays. Contrasting can be reversed for hydrophobic analytes, or any combination thereof, including mixed SAM applications.

5 The criteria for success with this type of target is to find general derivatization methods (for high contrast targets) that are not too labor intensive or costly to prohibit large-scale manufacture.

Individual targets (inserts)

10 A third target embodiment design is that of using individual areas (inserts) that after digestion can be inserted into a base that fits into the commercial mass spectrometers. This approach emulates the "matched set" targets described above. The inserts will be of either plateau or contrast design, and will be economical to derivatize using higher cost enzymes (by using smaller volumes of higher concentration reagents). These targets (even when derivatized with low-cost enzymes) are very economical in terms of cost in research applications where they
15 can be used one at a time.

The necessary limitation for success with this type of target is to construct "matched set" design targets as inserts fitting into the targets accepted by commercial instrumentation.

Biochips, and small array targets

20 Another embodiment of the target arrays is incorporating bioreactive surfaces into/existing chip-based bioanalytical platforms. Micro-channel devices (chips) are now used in protein analysis and are ideal platforms for biomolecular separation (in one dimension) followed by enzymatic processing (by driving separated biomolecule in a second dimension over an enzymatically-active area) and MALDI-
25 TOF analysis directly from the chip.

Other active surfaces, derivatization methods and assays

Amplifying media

30 In an another alternate embodiment surface amplifying media are used to increase the activity of the target array or the enzymatically-active targets. An example amplification is performed using solution based polymeric amplification techniques, either single step activated couplings, or in situ induced polymerization events. These modified surfaces display definite charge differences using either

WO 02/082051

PCT/US02/01541

carboxylic acid or amine amplifying reagents (which are in themselves either activated or activatable).

General Enzyme Immobilization Kits

A significant product according to the present invention is a fully-activated
 5 General Enzyme Immobilization Kit. The kits are comprised of a number of affinity micro-pipettes containing affinity microcolumns, activated or activatable targets or target arrays (whether amplified or not), and pre-made buffers. The purpose of the kits is to have the end-user derivatize targets in-house using proprietary enzymes, thereby eliminating shipment of reagents to the manufacturer for immobilization.

10 Ion-exchange surfaces

In still yet another embodiment, the targets or target arrays may be derivatized with carboxymethyl dextran (CMD) capable of a cation exchange process, which ultimately leads to higher quality MALDI-TOF spectra during the analysis of proteins in the presence of sodiated, and potassiumated buffers. Using the CMD targets,
 15 unwanted cations are scavenged from solution and replaced with protons or ammonium ions, dependent on which cation is used to pre-charge the targets.

Cation exchange (CE) targets

The value of CE surfaces has already been described; reduction of unwanted cations in buffer solutions to reduced signal heterogeneity thereby increasing mass spectral sensitivity (homogenization of signal). Reduction of alkali cations, using the
 20 CE surfaces, is also capable of improving matrix homogeneity during sample preparation. These attributes are of benefit to the MALDI-TOF analysis of both protein and nucleic acids. In one embodiment of a CE surface uses amplified surfaces of 500 kDa CMD. The 500 kDa CMD is chosen because of a higher
 25 exchange capacity than lower molecular weight CMD. It is estimated that approximately 10 picomole of CMD can be immobilized to the surface of a 4 mm² target. Considering that each strand of CMD will have ~ 1,000 valence sites for exchange (~30% of monomeric dextran converted to CMD), an exchange capacity of 10 nanomole is estimated for the targets, equating to a 1 µL aliquot of 10 mM alkali
 30 salt. However, the exchange properties of the CMD targets will have to be evaluated to determine the overall effectiveness in sample clean up. They are effective in alkali metal removal using a short single stranded DNA molecular (e.g., d(T)₈) mixed in the

WO 02/082051

PCT/US02/01541

presence varying concentrations (0.1 - 10 mM) of buffer salts. DNA is chosen for the test assay because of the high propensity to retain alkali metals as counterions to the negatively charge phosphate backbone.

Using standard CMD targets it is likely to reach an exchange limit below the buffer concentration ranges used in a number of biological applications. Stronger CE functionalities (e.g., sulfonate groups created by treatment of dextran with chlorosulfonic acid) and methods capable of greater surface amplification (application of polymeric resins to create macroscopic (10 - 100 micrometer surfaces)) may be used in order to raise the exchange capacity of the targets to a level capable of reducing deleterious effects experienced during the analysis of biomolecules present in moderate-high strength buffers.

Anion exchange (AE) targets or target arrays

Anion exchange targets or target arrays are a still further embodiment useful in sample cleanup by scavenging various anionic detergents from solution. Specifically, the presence of sodium dodecylsulfate (SDS) in protein solutions has always been of concern during MALDI-TOF analyses. SDS is generally disruptive of the crystal formation required for most of the MALDI matrices to function, and therefore needs to be removed from solution as part of sample preparation. Another anion that possibly has a deleterious effect on the MALDI process is phosphate ion.

Polylysine-amplified surfaces have intrinsically weak anion exchange properties. They are used in anion scavenging by analyzing test mixtures comprised of ~ 5 different proteins in the presence of various concentrations of SDS. Polylysine surfaces may not provide the exchange capacity or strength needed to scavenge SDS from solution at relevant concentrations (10's of millimolar). Diethylaminoethyl (DEAE) exchange groups may be used as a replacement for the polylysine. Three derivatization schemes creating DEAE are possible. The first possibility is to link diethylaminoethylamine to 500 kDa CMD using EDC-mediated chemistry or CDI-activation. A necessary limitation to this approach is need for complete saturation of the carboxylic acid groups with DEAE. If all groups are not converted to DEAE, the surface will have (unpredictable) characteristics of both the cation and anion functionalities. A second method will be to activate polylysine surfaces using 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene and link the DEAE to the surface through the

WO 02/082051

PCT/US02/01541

benzylolide. This has been done successfully using the 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene method for selectively immobilizing peptides via their N-termini. A possible downfall of this method, however, is the potential of severely cross-linking polylysine during the activation step, essentially making the surface inert to further derivatization. A third chemistry is to link diethylaminoethylamine to surfaces amplified with CD1-activated dextran. This method is a variation of the CD1- CMD derivatization, and should reduce heterogeneous cation/anion exchange properties, as well as have a significant exchange capacity. All of these preparation methods have been tried and assayed using test peptide mixtures in the presence of SDS.

10 Enzymes, assays, incubator

Enzymes

Another embodiment uses combinations of biomolecules to accomplish combined multifunctional operations. Combined profiling, for example, uses two enzymes, such as endoproteases in combination with alkaline phosphatase, capable of mapping and subsequent dephosphorylation of biomolecules. Such an application is of value when elucidating the specific phosphorylation sites present in e.g., regulation proteins. The immobilization of the phosphatases with various endoproteases is accomplished with the ultimate goal of generating surfaces capable of pH-dependent operation. Activity can be gauged by assaying small phosphopeptides available from commercial suppliers.

20 Yet another embodiment uses snake venom phosphodiesterase (PD). Through partial sequencing, targets successfully derivatized with PD will add an extra dimension of specificity of PCR-based primer extension methods used in the analysis of short DNA fragments containing mutations present in DNA micro-satellites. The immobilization of PD to bioreactive targets may be accomplished, by gauging activity using small oligonucleotides. Studies involving both AP and PD relies on the general derivatization protocols according to the present invention.

Incubator

A common occurrence during proteolytic digestion using bioreactive targets in combination with the affinity microcolumns is the tendency of the sample to dry out (on the target or target array) during the course of digestion. A modified oven/incubator capable of performing digests over a range of temperatures (25 - 60

WO 02/082051

PCT/US02/01541

°C) has been constructed that surrounds the bioactive targets in a constant humidity environment. Digests have been performed for times greater than one-hour using this incubator with little loss in sample volume. The device is small and portable (dimensions: 4"x6"x1"; wt. ~ 0.5 lbs.; 120 V), operates at a single temperature (40°C) – sufficient for most applications of the bioactive array), capable of maintaining a sample volume of 1-2 µL for times as long as one-hour using "matched set" targets, and amenable to use with robotic stations.

Biomolecular Applications

EXAMPLE 18

Beta-2-microglobulin (β_2m) analysis from urine

Porous glass molecular traps, manufactured according to example 1 above, were activated and derivatized in batches (30-50 per batch) prior to packing into the pipettor tips forming an affinity pipette. After acid conditioning (with 0.05 M HCl for 1-hour, air-dried), the porous glass molecular traps were treated with 10% amino-propyl triethoxysilane (Aldrich, Milwaukee, WI) in anhydrous toluene for 12-under reflux. The amino-functionalized porous glass molecular traps were then equilibrated in reaction buffer (100 mM sodium phosphate, pH 4.3, 100 mM NaCl) for 15 minutes in a reaction vessel under slight vacuum. After equilibration, the buffer was replaced with a mixture of 15 kDa molecular mass carboxylated dextran (CMD, Fluka, Milwaukee, WI) and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC, Sigma, St. Louis, MO) (10 mg/mL each in the reaction buffer) and the air was again evacuated from the reaction vessel. The reaction was allowed to proceed for 1 hour (with two subsequent additions of EDC to the reaction mixture at ~ 20 and 40 minutes into the reaction) before terminating and rinsing. Prior to coupling of the antibody, the CMD-amplified porous glass molecular traps were rinsed vigorously with 100 mM sodium phosphate, pH 8.0, 0.5 M NaCl. The porous glass molecular traps were then activated for 10-minutes with EDC/*N*-hydroxy succinimide (NHS, Sigma, St. Louis, MO) (100 mM each, in H₂O) and incubated with the affinity purified rabbit anti-human β_2m IgG (DAKO, Carpinteria, CA) (0.1 mg/mL, in 20 mM sodium acetate, pH 4.7). Uncoupled antibody was removed by extensive rinsing with HBS buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.005% Surfactant P20). This manufacturing process yielded affinity pipettes with a binding capacity estimated at

WO 02/082051

PCT/US02/01541

10-100 pmol, while having a dead volume of approximately 1.5 μ L. The anti- β_{2m} affinity pipettes were found to be stable and active for a period of at least three-months following antibody immobilization (by storing at 4 °C in HBS buffer).

Biological fluids

5 All fluids were obtained immediately prior to use; protease inhibitor cocktail (PIC, Protease Inhibitor Cocktail Set III, Calbiochem, La Jolla, CA) was added immediately in order to minimize possible proteolytic degradation of β_{2m} .

Tears. Human tears were collected by washing the eye with doubly-distilled water (ddH₂O) and collecting the rinse. A 20 μ L aliquot of the eye rinse was mixed with 180 μ L HBS buffer and used as stock tears solution. This stock was further diluted by a factor of ten with either water, (for MALDI-TOF analysis) or HBS buffer (for Mass Spectrometric Immuno-Assay (MSIA) analysis).

10 *Plasma.* 44.7 μ L of human whole blood were collected under sterile conditions from a lancet-punctured finger using a heparinized microcolumn (Drummond Scientific Co., Broomall, PA), mixed with 205 μ L HBS buffer and centrifuged for 30 seconds (at 7,000 \times g) to pellet the red blood cells. A 50 μ L aliquot of the supernatant was mixed with 200 μ L HBS and the resulting solution was used for MSIA; an aliquot was further diluted (10 fold) with ddH₂O for MALDI-TOF analysis.

15 *Saliva.* Human whole saliva was diluted by a factor of 100 in ddH₂O or HBS buffer in preparation for MALDI-TOF or MSIA, respectively.

20 *Urine.* Human urine was prepared for MALDI-TOF by a 100-fold dilution with ddH₂O; a two-fold dilution with HBS buffer was used for MSIA.

Mass Spectrometric Immunoassay (MSIA)

MSIA was performed on the biological fluids by repeatedly drawing a fluid (~20 times) through an anti- β_{2m} -affinity pipette using a hand-held P-200 micropipettor. After the repetitive-flow incubation, the affinity pipette was rinsed with 2 mL of HBS buffer (by drawing the HBS through in 200 μ L aliquots and then discarding), followed by a 1 mL rinse with ddH₂O (using the same wash and discard approach). At the final discard of the water rinse, it was checked that all residual water was expelled from the affinity pipette. The retained compounds were eluted from the affinity pipette by drawing a 3 μ L aliquot of matrix solution (saturated solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (AOC-A; Aldrich, Milwaukee, WI) in 1:2, acetonitrile:ddH₂O,

WO 02/082051

PCT/US02/01541

0.2% TFA) into the affinity pipette (enough to cover the microcolumn), upon which the matrix/solvent mix was deposited directly onto a MALDI-TOF target. MALDI-TOF mass spectrometry was performed using a mass spectrometer. Briefly, the instrument uses a two-stage 30 kV (2x1 cm; 15 kV/stage) continuous-extraction source to accelerate ions to the entrance of a 1.4 m flight tube containing an ion guide-wire. Ions generated using a pulsed N₂ laser (337 nm) were detected using a hybrid single channel plate/dynode multiplier biased at -3.8 kV. Spectra were recorded using an averaging transient recorder while monitoring individual laser shots using a separate oscilloscope and attenuating laser intensity (in real-time) during acquisition. All spectra were acquired in the positive-ion mode.

Quantification

Internal reference. Equine β_{2m} ($E\beta_{2m}$) was chosen as an internal reference for quantification because of its high degree of similarity to human β_{2m} ($H\beta_{2m}$) (~75% sequence homology), resolvable mass difference from $H\beta_{2m}$ ($MW_{E\beta_{2m}} = 11,402.9$; $MW_{H\beta_{2m}} = 11,729.7$) and because it was easily obtainable. Horse urine was collected fresh (at a local stable) and treated immediately with protease inhibitor cocktail. Low solubility compounds were removed from the urine by overnight refrigeration (at 4 °C) followed by centrifugation for 5 minutes at 5,000 x g. The urine was then concentrated 20-fold over a 10-kDa MW cut-off filter, with repetitive HBS and water rinses and with several filter exchanges (4 filters/200 mL urine). Treatment of 200 mL fresh urine resulted in 10 mL of β_{2m} -enriched horse urine which served as stock internal reference solution for ~100 analyses.

Working curve. Quantification of $H\beta_{2m}$ was performed. Briefly, standards were prepared by step-wise dilution (i.e., x 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 and 0.1, in HBS) of a 1.0 mg/L stock $H\beta_{2m}$ solution to a concentration of 0.1 mg/L; the 0.1 mg/L solution served as stock for an identical step-wise dilution covering the second decade in concentration (0.01-0.1 mg/L). A blank solution containing no $H\beta_{2m}$ was also prepared. The samples for MSIA were prepared by mixing 100 μ L of each of the standards with 100 μ L of stock horse urine and 200 μ L of HBS buffer. MSIA was performed on each sample as described above, resulting in the simultaneous extraction of both $E\beta_{2m}$ and $H\beta_{2m}$. Ten 65-laser-shot MALDI-TOF spectra were taken from each sample, with each spectrum taken from a different location on the target. Care was taken during

WO 02082061

PCT/US02/01541

data acquisition to maintain the ion signals in the upper 50-80% of the y-axis range and to avoid driving individual laser shots into saturation. Spectra were normalized to the $E\beta_{2m}$ signal through baseline integration, and the integral of $H\beta_{2m}$ was determined. Integrals from the ten spectra taken for each calibration standard were averaged and the standard deviation calculated. A calibration curve was constructed by plotting the average of the normalized integrals for each standard versus the $H\beta_{2m}$ concentration.

Screening. Urine samples were collected from individuals, treated with protease inhibitor cocktail and cooled to 4 °C. The urine samples were centrifuged for 5 minutes (at 5000 x g) immediately prior to analysis to remove any precipitated material. In preparation for MSIA, 100 μ L of each urine sample was mixed with 100 μ L of stock horse urine and 200 μ L of HBS. This treatment is identical to that used in preparation of the working curve, with the exception of replacing the standard with the human urine sample. MSIA was performed as described in the working curve section.

Affinity pipette Evaluation/Biological fluids Screening.

The affinity pipettes were evaluated by screening a number of easily obtainable biological fluids. The intent of the screen was to gauge the degree of non-specific binding encountered from each of the fluids and to briefly investigate alternative rinsing protocols that reduce contributions from non-specific binding. Fig. 2a shows a MALDI-TOF spectrum of diluted human tear and a spectrum showing tear compounds retained during MSIA. High-level proteins present in the tears dominate the MALDI-TOF spectrum: lysozyme ($MW_{calc} = 14,696$; $MW_{obs} = 14,691$) and tear lipocalin ($MW_{calc} = 17,444$; $MW_{obs} = 17,440$). Other polypeptide signals are observed in the 2-5 kDa range, as well as a low-intensity signal at $m/z = 11,727$ Da, presumably due to β_{2m} . The MSIA spectrum shows signals due to the selectively retained β_{2m} ($MW_{calc} = 11,729$; $MW_{obs} = 11,731$) and attenuated signals for the lysozyme and other non-specified compounds. Fig. 2b shows MALDI-TOF and MSIA spectra of diluted human plasma. As is commonly observed during direct analysis of serum or plasma, the MALDI-TOF spectrum is dominated by signals originating from albumin. Other lower m/z signals are also present; however, β_{2m} signals are not observed. The MSIA spectrum shows strong signals due to the selectively retained β_{2m} and few other

WO 02/082051

PCT/US02/01541

signals from non-specified compounds. Fig. 2c shows spectra of diluted saliva (MALDI-TOF) and salivary proteins retained during MSIA. The MALDI-TOF spectrum shows a number of signals in the 1-18 kDa range, most prominently in the peptide region; signals corresponding to β_{2m} are not observed. The MSIA spectrum, obtained after using the normal rinse protocols, shows signals due to the selectively retained β_{2m} and an abundance of non-specified compounds in the low molecular mass range. A second MSIA analysis was performed in which an additional rinse with 0.05% sodium dodecylsulfate (SDS) was included between the HBS and the ddH₂O rinses (Fig. 2c). The SDS rinse, although not completely eliminating the low mass signals, did significantly reduce their contribution to the mass spectrum without a proportional reduction of the β_{2m} signal. Fig. 2d shows spectra resulting from the analysis of human urine. The MALDI-TOF spectrum shows a number of signals in the peptide region and an absence of signal for β_{2m} . The MSIA spectrum is dominated by signals from the β_{2m} , with few additional signals from non-specified compounds.

The porous glass molecular traps used in the affinity pipettes performed well in the screening of the biological fluids. Intermediate CMD amplification of the amine functionalized porous glass molecular traps provided a largely hydrophilic surface with multiple attachment points (carboxylic acid groups) for coupling of the antibody. As a result, the antibody load of each affinity pipette is more than sufficient to capture low levels of β_{2m} without saturation of the antibody. Also, the hydrophilic surface can be washed free of most non-specifically bound compounds by rinsing with aqueous ionic buffers. With the exception of the saliva sample, MSIA exhibited reasonably clean mass spectra showing predominantly signals derived from β_{2m} . The SDS wash of the saliva screen, although improving spectral quality, did not completely eliminate all of the non-specified compounds. Upon closer investigation it is found that those compounds (identified by mass as lysozyme, α -defensins and histatins) have pIs of ~10, suggesting retention via charge interactions (with free-carboxyl groups) that are not broken by the moderate pH (7.8) and salt (150 mM NaCl) content of the HBS buffer. Thus, other rinsing combinations (e.g., high-salt or different detergents) will need to be investigated if the salivary screen is deemed to be of biological significance. It is worth noting, however, that the presence of the non-

WO 02/092051

PCT/US02/01541

specified compounds (in any of the samples) did not interfere with the unambiguous determination of β_2m , which was identified by virtue of direct detection at its characteristic molecular mass.

Quantification

Protein quantification using MALDI-TOF requires use of internal standards to compensate for varying laser intensities and spot-to-spot differences in sample composition that give rise to fluctuations in analyte ion signal. Although proteins with characteristics unlike those of the analyte may be used as internal standards (as has been shown during protein quantification directly from mixtures or during MALDI-TOF quantification of affinity-retrieved species by addition of an internal reference standard to peptides eluted from beaded affinity media), internal reference standards that behave similarly to the analyte during laser desorption/ionization are generally preferred. This prerequisite is met during MSIA by choosing internal references that share sequence homology with the target protein: enzymatic/chemically-modified versions of the targeted protein, truncated/extended recombinant forms of the target proteins, the (same) target protein recombinantly expressed in isotopically-enriched media (e.g., ^{15}N or ^{18}O), or the same protein from a different biological species. Given that the receptor is able to capture both the target protein and the internal reference, MSIA can be designed around a single receptor system. Alternatively, a two-receptor system can be considered where one receptor is used to retrieve the target protein and a separate receptor is used to retrieve the internal reference.

The internal reference chosen herein was equine β_2m ($E\beta_2m$), which shares ~75% homology with its human counterpart and is ~300 Da lower in mass than $H\beta_2m$ (thus, both species share similar characteristics and are easily resolved in the mass spectra). Even though no data could be found on the relative dissociation constants between the polyclonal anti- β_2m IgG and $H\beta_2m$ or $E\beta_2m$, preliminary studies showed that the antibody exhibited cross-reactivity sufficient to retain both species. Fig. 3a shows spectra representing MSIA analyses of $H\beta_2m$ standards in a concentration range of 0.01-1.0 mg/L. Each spectrum, normalized to the $E\beta_2m$ signal, is one of ten 65-laser shots spectra taken for each calibration point. Plotting the average of the 10 normalized $H\beta_2m$ integrals for each standard versus the $H\beta_2m$ concentration results in the working curve shown in Fig. 3b. Linear regression fitting of the data yields

WO 02/082051

PCT/US02/01541

$I_{320m}/I_{220m} = 4.09 [I\beta_{2m} \text{ in mg/L}] + 0.021$ ($R^2 = 0.983$), with a working limit of detection at a $S/N > 3$ of 0.0025 mg/L (210 pM) and a limit of quantification of 0.01 mg/L (850 pM). The standard error of all points of the working curve is ~ 5 %.

Quantitative Determination of β_{2m} in Urine Samples

Ten samples were collected from four individuals: female (31 years, pregnant; 1-sample (F31)), male (30 years; 4-samples over two days (M30)), male (36 years; 2-samples over two days (M36)) and male (44 years; 3-samples over two days (M44)). All of the individuals were in a state of good health when the samples were collected. Results from MSIA of the ten urine samples are shown in Fig. 4. The bars depict the β_{2m} concentration determined for each sample, while the inset spectra above each bar show the respective $H\beta_{2m}$ signals normalized to $E\beta_{2m}$. The data for the ten samples show remarkable consistency, with an average β_{2m} concentration of 0.100 ± 0.021 mg/L (high = 0.127 mg/L; low = 0.058 mg/L). An additional analysis was performed on a urine sample obtained from an 86-year old female (F86) who had recently suffered a renal infection. Because of the significantly higher level of β_{2m} found in this sample (see inset spectrum) it was necessary to quantitatively dilute the urine by a factor of ten in order to keep the β_{2m} signal inside the dynamic range of the working curve and accurately establish the β_{2m} concentration in F86 (at 3.23 ± 0.02 mg/L).

Past Traversalal Modifications

The mass-selective detection of MSIA makes possible the discovery and quantification of variants of β_{2m} that may be present in urine. During quantitative screening of the urine samples, a second, higher molecular mass species ($\Delta m = +161$ Da) was co-extracted with the β_{2m} . The species is presumably a glycosylated (one hexose) form of β_{2m} , and is observed most prominently in F86. Fig. 5 shows an overlay of two MSIA spectra taken from the urine of F86 (diluted x 20) and M36 (no dilution; given for comparison). The level of glycosylated β_{2m} is much greater in F86 than in M36. The specific cause of the elevated level of the glyco- β_{2m} is at present uncertain.

Previous work has reported the quantification of glycosylated $H\beta_{2m}$ by direct MALDI-TOF analysis of serum into which glycosylated $H\beta_{2m}$ was doped at reasonably high concentrations. Due to poor mass spectral resolution and interferences from the serum, a curve-fitting routine was used to deconvolute signals

WO 02/082051

PCT/US02/01541

from multiple $H\beta_{2m}$ glycoforms, the integrals of which were then normalized to wild type β_{2m} for use in constructing a working curve of reasonable linearity ($R^2 = 0.88$). Although the data presented here is significantly better and clearly able to support rigorous quantification without aid of fitting routines, it is uncertain whether the

5 working curve constructed for the unmodified β_{2m} can be used directly for the rigorous quantification of the glycosylated β_{2m} . Such correlation requires that the affinity constants for, and the desorption/ionization efficiency of, both β_{2m} forms are equal. Regarding the affinity constants, the affinity-purified polyclonal antibody used herein clearly shows broad cross-reactivity (as demonstrated by the co-extraction of

10 $H\beta_{2m}$ and $E\beta_{2m}$) so it is highly probable that both $H\beta_{2m}$ forms are extracted with similar efficiencies. Similarly, the addition of a single carbohydrate moiety should not severely attenuate the relative desorption/ionization efficiency. As a result, the concentration of the glycosylated β_{2m} form might be estimated using the β_{2m} -working curve at 0.072 mg/L – roughly the same concentration as wild type β_{2m} in

15 the urine samples from the healthy individuals.

Regardless of whether both wild type and glycosylated β_{2m} can be quantified using a single working curve, it is important to note that the concentration of the wild type β_{2m} determined during MSIA does accurately reflect the concentration of only the wild type β_{2m} and not the combination of both of this species. Thus, MSIA holds

20 a particular advantage over other techniques that are unable to differentiate between similar forms of a target analyte. In that elevated β_{2m} levels are used as a general indicator of immune system activity, while β_{2m} -glycosylation has been associated with more specific ailments (e.g. advanced glycosylated end-products associated with dialysis related amyloidosis), MSIA is able to deconvolute these independent

25 contributing factors and yield results that more accurately connect a specific biomarker with a specific ailment.

The manufacturing process used in this report yielded affinity pipettes with an estimated binding capacity of 10-100 pmol, while having a dead volume of approximately 1.5 μ L. This binding/elution ratio was found to adequately match the

30 β_{2m} concentrations found in the biological fluids. Moreover, the efficient capture of β_{2m} using the affinity pipettes kept the sampling volume low (less than 100 μ L of biological fluid). In addition, the affinity pipette chemistries employed herein

WO 02/092051

PCT/US02/01541

exhibited little non-specific binding for three of the four biological fluids, and even in the fourth (saliva) did not introduce analytical interferences into the analysis.

The quantitative capabilities of MSIA are clearly demonstrated in the present invention. The β_2m concentration range investigated herein (0.010 - 1.0 mg/L) is adequate to cover the β_2m levels in all fluids. Good linearity is observed over the two decade ranges ($R^2 = 0.983$) with an overall error of ~ 5%. Important to accurate quantification is the choice of an appropriate reference standard, which in this example was fulfilled by use of horse urine enriched in β_2m . However, even though the horse urine is viewed as an ideal background media (because it more closely mimics the true analytical media than buffers), it will need to be replaced in future analyses with purified E β_2m in order to ensure consistency when analyzing a large number of samples over long periods of time.

Although the screening study presented here was not extensive enough to be considered a clinical study, it does demonstrate the utility of MSIA in accurately identifying and quantifying β_2m directly in biological samples, such as urine samples. The four baseline individuals contributing urine to the project were considered healthy, not suffering from any known genetic afflictions linked to β_2m or having suffered from any ailments in the month immediately preceding the analyses. Qualitative evaluation of the β_2m retained from the samples revealed single signals for β_2m with molecular mass corresponding to the wild-type sequence of the protein (within 0.02% experimental error; spectra internally calibrated by using the E β_2m signals; see Fig. 4). Quantitative analysis within the group showed remarkably constant β_2m levels that are consistent with those found in control groups during other studies. By contrast, the urine samples obtained from an older individual of poor health showed a marked increase in urinary β_2m level (~30-times greater). It should be noted that this estimate was made without interference from a higher-mass variant of β_2m , which was readily detectable in the mass spectra (see Fig. 5). The most reasonable explanation for the observation of two mass-shifted (yet related) signals in the mass spectrum is the presence of 1) the wild-type protein, and 2) a variant existing due to either a genetic polymorphism or a posttranslational modification. In this particular case, the variant is most easily identified by the mass shift of +161 Da as a glycosylated form of β_2m ; variants due to genetic polymorphisms are essentially

WO 02/082051

PCT/US02/01541

ruled out because the mass shift is greater than that resulting from any single nucleotide polymorphism (i.e., [TGG] - [GGG]; resulting in Trp - Gly; $\Delta m = 129.15$ Da). However, had variants possessing a significant mass shift (>15 Da) as a result of a genetic polymorphism been present in the sample, they would have been as readily
 5 recognized as the glycosylated β_2m .

Lastly, in that MSIA analyses are fairly rapid and relatively easy to perform, the approach lends itself particularly well to the rapid development of analytical methods and the analysis of large numbers of samples. The rapid rate of analysis opens the possibility of real-time method development in which changes in incubation
 10 and rinse protocols can be readily implemented when the results from a just completed trial are analyzed. Once developed and optimized, these methods could be readily applied to screening of biological fluids. Herein the samples were analyzed at a rate of ~ 3/hour, which allowed for several analyses to be performed on a given individual within a single day (as shown in Fig. 4, M30). This rate of analysis was
 15 essentially limited by instrumentation that is not designed to accommodate multiple samples - each analysis herein (preparation-through-analysis) was performed individually. However, it is feasible to increase this rate of analysis to hundreds-per-day by use of parallel pipetting stations and mass spectrometers that accept multiple samples on an arrayed format. In this manner, pipetting stations addressing 96-well
 20 format titer plates will now be described to simultaneously prepare, modify, incubate, capture and rinse the multiple samples using multiplexed affinity pipettes. The samples are then eluted onto a mass spectrometer target array of the same format.

Robotic integration

The mass assay system, Fig. 7a, is a system for high throughput nascent
 25 biological fluid analyte extraction by affinity microcolumns within a conduit system comprising one or more functional pre-, use, analysis, and post- stations. The pre-stations initiate sample information, organize, prepare and formulate components, sample arrays and targets for primary and analysis workstation use. Sample identification, performed on incoming biological fluids, which ascertains initial
 30 sample parameters, such as bio-sample type (blood, urine, cell culture media, etc.), patient history, disease state, chemical parameter profile (pH, turbidity, etc.), and the like, results in a sample classification database for integration with final output

WO 02/082051

PCT/US02/01541

analysis data promoting congruent and feedback databases. Pre-station high performance fluid manipulation, with accompanying labeling and tracking, allows for distribution of identified biological fluid from sample source into compartmentalized individual sampling array, labeled (e.g., bar-code/laser reader) for tracking, with further inline manipulation, such as appropriate dilution or modification (pH, surfactant addition, etc.). Another function of the pre-station is formulation and loading of the array components. Here, component arrays, including, but not limited to, solid components (plastics, glasses, metals and the like), fluid reagents, targets and the like, are formed and/or distributed into appropriate arrays and loaded into the primary workstation. From the prestation, the array of molecular traps are accessed by an initiation/reservoir/sample station, the primary station, or relocated to a use station for sample processing.

Example processes performed in the prestation include, but are not limited to, assembly of porous molecular traps into affinity pipettes, array labeling, sample preparation, sample modification. These processes are carried out using solid sample array(s) (plastic microtiter plates, etc.), array labels, chemical/modifying reagent (e.g. storage reagents, activation reagents, buffers, surfactants, reducing reagents, etc.), affinity reagents and ligands (biological mimics, antibody(s), antigen(s), etc.), rinse fluids (buffers, ultra pure water, etc.), desorption fluids (MALDI matrix, acids, bases, surfactants, etc.) and analysis target(s).

The pre station combines ligand and analyte in separate microcolumn activation, sample retrieval/separation and sample transfer/elution functions. Preferably, multiple samples are loaded into the pre station and spatially arranged in an array commensurate with the array of molecular traps with one sample for each molecular trap in the array of molecular traps.

From the pre station, the array of samples is automatically relocated to a use station. The use station is where the sample, and specific analytes contained therein are processed. In one embodiment, one end of the array of molecular traps is lowered into the sample and the same sample is drawn into each molecular trap. Since each molecular trap has affinity receptors located on surfaces of the molecular trap, drawing the sample into the molecular trap contacts any specific analyte sought after with the affinity receptors. In the array, each molecular trap may have different

WO 02/082051

PCT/US02/01541

affinity receptors from that of other molecular traps in the array, thereby enabling the targeting of different specific analytes from the same or different media. Sample material may be drawn into the molecular trap singly or multiple times. After sufficient specific analyte has been captured by the molecular traps in the array, residual, or non-captured, media are washed away with at least one rinse. (However, other embodiments may not require a rinse step.) After non-targeted compounds have been washed away, captured specific analyte are eluted from the molecular traps by contacting them with a solution selected to interrupt the affinity interaction. The eluted specific analytes are then either prepared directly for mass spectrometry or for further processing, e.g., enzymatical/chemical modification, followed by subsequent preparation for mass spectrometry. The pre stations may comprise multiple positions for chemical modification, molecular trap functionalization, biological fluids analysis and/or transfer. Finally, the eluted specific analytes are relocated to a target array by stamping them onto the target array.

With reference to Fig. 7b, a preferred embodiment of the use station further comprises a microcolumn manifold to which the array of molecular traps are attached. The microcolumn manifold attaches to a robotic head that then physically moves the array of molecular traps between each processing station. This physical movement of the microcolumn manifold may be in a rectangular (xy) or circular (carousel) manner. Alternatively, the microcolumn manifold in the use station may be stationary and the processing stations relocated under the array of molecular traps. Like the physical movement of the microcolumn array described above, the physical movement of the processing stations may be in a rectangular (xy) or circular (carousel) manner. A further embodiment contemplates the physical movement of both the microcolumn manifold and the processing stations together.

In a preferred embodiment, the target array is automatically relocated to a storing/loading station that is capable of containing at least one target array. From the storing/loading station, the target array is transferred into an automated mass spectrometer capable of multi-sample input and automatic processing/data analysis using an interactive database.

Automated mass spectrometry is performed with either the specific analyte or modified fragments detected with high precision. Software capable of recognizing

WO 02/082051

PCT/US02/01541

differences between samples, or from a standard, is used to aid in the analysis of large numbers of samples and generate proprietary databases from which to establish novel information systems i.e., structure function systems, clinical systems, diagnostic systems and biochemical systems. Biochemical systems generally refer to a chemical interaction that involves molecules of the type generally found within living organisms, including the full range of catabolic and anabolic reactions which occur in living systems such as enzymatic, binding, signaling and other reactions. Other, biochemical systems, includes model systems that are mimetic of a particular biochemical interaction. Examples demonstrated within the context of this present invention or of interest in practicing the present invention include, e.g., receptor-ligand interactions, protein-protein interactions, enzyme-substrate interactions, cellular signaling pathways, transport reactions, genotyping and phenotyping.

After analysis by mass spectrometry, the target array may be transferred to a post-station for sample processing or additional analysis subsequent to the mass spectrometric analysis.

Accordingly, in one aspect, the present invention will be useful in screening for ligands or compounds that affect an interaction between a receptor molecule and its ligand.

IN-ROBOT Functionality

EXAMPLE 19

In-robot amine activation/derivatization of functionalized porous molecular traps

Another approach involves robotic integration of the previously mentioned formats during which such protocols as glutaraldehyde activation and ligand coupling, are used in a concerted in-robot activation/derivatization. Here, amine functionalized porous glass molecular traps are dry loaded/beated (either manually or machine assisted) into warm p-200 wide bore pipette affinity pipettes (Robbins Corp.) and loaded into a plastic 96 rack. This rack is integrated onto station one of a six-staged robot, loaded with microtiter plates containing various coupling and rinsing solutions, that is linked to a personal computer and software controlled. Glutaraldehyde coupling to amine microcolumns occurs via a first 96 well microtiter plate containing 110 μ L per well of 2.5% glutaraldehyde solution in 0.10 M sodium phosphate buffer, pH 7.8, stationed at position two, using one-hundred aspiration repetitions. This initial

WO 02/082051

PCT/US02/01541

coupling step requires extensive HBS buffer rinses (110 μ L/well) attained at station three (containing a second 96 well microtiter plate, fifty aspiration repetitions), resulting in a rapid in-robot mediated activation coupling (reaction time 10-20 minutes). After a final water rinse at station four (~fifty aspiration repetitions), the activated aldehyde groups on the glutaraldehyde matrix are incubated with the protein antibody of interest at station five (0.1-1 mg/mL, 55 μ L/well, 200 aspirations). Uncoupled (excess) antibody is removed by extensive rinsing at station six with HBS buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.005% Surfactant P20, fifty aspiration repetitions).

EXAMPLE 20

In-robot amine activation, amplification, reactivation and derivatization of amine microcolumns

An extension of the approach demonstrated above is robotic integration of glutaraldehyde activation with subsequent in-robot amplification with recurring activation prior to ligand coupling, as a concerted in-robot activation/amplification/derivatization. In this example, aldehyde functionalized porous glass molecular traps (aldehyde microcolumns) are prepared and loaded into positioned one. Then the activated aldehyde groups on the glutaraldehyde microcolumns are incubated with polylysine (30-300 kDa) loaded at position two (110 μ L, 1 mg/mL, in HBS) of the robot stage, resulting in formation of a polymeric scaffold from which to conduct another round of glutaraldehyde mediated activation and antibody conjugation to the amplified micro-top surface.

This initial coupling step is followed by extensive rinses at station three, fifty aspiration repetitions of HBS buffer, resulting in a rapid in-robot mediated activation coupling (reaction time half an hour). After a final water rinse at station four (~fifty aspiration repetitions), the activated aldehyde groups on the glutaraldehyde matrix are incubated with the protein antibody of interest at station five (0.1-1 mg/mL, 55 μ L/well, 200 aspiration repetitions) after which the MASSAY microcolumns become affinity pipettes. Uncoupled (excess) antibody is removed by extensive rinsing at station six with HBS buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.005% Surfactant P20).

EXAMPLE 21

WO 02/082051

PCT/US02/01541

MALDI-TOF chemically masked target preparation for microcolumn elution

Arrayed targets present hydrophilic targets that function to localize analyte samples delivered from microcolumns under eluting conditions. These elution conditions vary depending upon the analysis intent, ranging from the general use of MALDI-TOF matrix (ca., alpha cyano-4-hydroxy cinnamic acid in 1:2 ratio of acetonitrile:0.2% TFA in water), dilute acids, dilute bases, chaotropic agents and the like.

In the present example, the target surface consists of a contrast array where a hydrophilic target functions in concert with a hydrophobic background in a chemical mask prepared for a directed analysis, depending upon the type of bio-media used in the assay of interest. Regardless of the intent, the first requirement is cleaning of the surface in a series of rinses and incubations. Initially the target surface is cleaned with detergent, water rinsed, methanol rinsed, and then incubated with 10-15% hydrogen peroxide solution in water at room temperature (or elevated temperatures) for thirty minutes to one hour. After which the cleaned surface is rinsed in water, methanol, nitrogen dried and the target areas derivatized with the alkyl mercaptan of interest. For a cation exchange surface 11-mercaptoundecanoic or 3-mercapto-1-propenesulfonic acid is used as a saturated solution prepared in an organic solvent (ca., isopropanol). The surface is either coated with a saturated solution of octadecyl mercaptan immediately or rinsed with isopropanol followed by methanol and subsequently coated with a saturated solution of octadecyl mercaptan. A chemically contrasted, or masked, surface results for microcolumn analyte localization and sample analysis by mass spectrometry. These cation exchange surfaces are designed for working in a general biological media and are particularly useful when assaying out of time. Alternatively, masked targets are generated with positively charged groups for use as anion exchangers.

EXAMPLE 22

Integrated high throughput system MALDI-TOF analysis of biological samples

Integrated system parallel processing and analysis of biologically relevant biomolecules out of unsorted biological fluids is illustrated in this example demonstrating the capabilities of the high-throughput system. Demonstrated in Fig. 8 is the high-throughput semi-quantitative analysis of beta-2-microglobulin (β_2m) from

WO 02082051

PCT/US01/01541

human plasma samples performed using the integrated system and methods of the present invention. Aliquots of diluted (5 fold) human plasma samples collected from six individuals were prepared for parallel screening on a 96-well sample plate. Each well received a 15 μ L plasma aliquot (the samples from the six individuals were
 5 randomized on the 96-well plate), 7.5 μ L of equine plasma (undiluted, containing equine β_{2m} , $MW_{app} = 11,396.6$, $MW_{iso,app} = 11,729.2$) and 128 μ L of HBS (0.01 HEPES, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.005% (v/v) polysorbate 20, 3 mM EDTA) buffer. Eight of the 96 samples were chosen at random and 0.5 μ L of 10^{-2} mg/mL solution of β_{2m} was added to four of them and 1 μ L of the same β_{2m} solution to the other four
 10 wells. Parallel sample processing entailed simultaneous incubation/capture of the 96 samples on 96 anti- β_{2m} derivatized microcolumns. The polyclonal anti- β_{2m} microcolumns were made via carbocymethyl dextran (CMD)-EDC mediated coupling of the antibody to amino-coated/modified microcolumns. Captured proteins were eluted from the microcolumns with a small volume of MALDI matrix (saturated
 15 aqueous solution of α -cyano-4-hydroxyiminoacetic acid (ACCA), in 33% (v/v) acetonitrile, 0.2 % (v/v) trifluoroacetic acid) and stamped onto a MALDI target array surface comprised of self-assembled monolayers (SAM) chemically masked to make hydrophilic/hydrophobic contrast target arrays. Each sample spot on the target array was analyzed using mass spectrometry and the relative β_{2m} abundance determined by
 20 an automated MALDI-TOF mass spectrometric analysis software routine. The mass spectra resulting from the high-throughput analysis of the 96 samples are shown in Fig. 8. Spectra taken from the samples that had the β_{2m} standard solution added are shaded.

Fig. 9 bar graph visualization performs interpretation of the high-throughput system generated semi-quantitative data shown in Fig. 8. Each spectrum shown in
 25 Fig. 8 was normalized to the equine β_{2m} signal through baseline integration, and the normalized integral for the human β_{2m} signal determined. All β_{2m} integrals from spectra obtained from samples from the same individual were averaged and the standard deviation calculated. In the same way, the integrals for the samples spiked
 30 with 0.5 and 1.0 μ L solution of 10^{-2} mg/mL β_{2m} were calculated and averaged. Plotted in this figure are the average values of the normalized human β_{2m} integrals for the samples from the six individuals and the spiked samples. The bar graph

WO 02/082051

PCT/US02/01541

clearly establishes increased β_{2m} levels in the spiked samples, illustrating the value of the high-throughput semi-quantitative analysis performed with the system and methods described in this invention in establishing increased β_{2m} levels in human blood that are associated with various disease states.

Another demonstration of the integrated system and methods described within the present invention comes from Fig. 10 high-throughput quantitative analysis of β_{2m} from human blood. The plasma samples from six individuals were prepared as described in Fig. 8. Eighty-eight wells of the 96-well sample plate received 15 μ L plasma aliquots (the samples from the six individuals were randomized on the 96-well plate), 7.5 μ L of equine plasma (undiluted) and 128 μ L of HBS buffer. A series of dilutions of a 7.6×10^4 mg/mL standard solution of purified human β_{2m} were prepared (spanning a concentration range of 7.6×10^4 to 1.14×10^4 mg/mL) and used as samples (15 μ L of each) in the last column (8 wells) on the 96-well plate. Parallel sampling processing and MALDI-TOF MS analysis was performed as described for Fig. 8, using the polyclonal anti- β_{2m} microcolumns. The mass spectra resulting from the high-throughput analysis of the 88 samples and the 8 standards are shown in this figure. Spectra taken from the standard samples are shaded.

Fig. 11b is the calibration curve constructed from the Fig. 11a data for the standard samples shown in Fig. 10. The calibration curve is presented for the purpose of determining the β_{2m} concentrations in the human plasma samples screened via the high-throughput analysis using the integrated system and methods described in the present invention. Representative spectra of the data for each standard used to generate the working curve are presented overlain in Fig. 11a. Each spectrum was normalized to the equine β_{2m} signal through baseline integration, and normalized integrals for the human β_{2m} signals determined. Integrals from five spectra taken for each calibration standard were averaged and the standard deviation calculated. A calibration (standard) curve was constructed by plotting the average of the normalized integrals for each standard vs. the human β_{2m} concentration in the standard sample (adjusted for the human plasma dilution factor). The working curve generated is shown in Fig. 11b. The concentration range was spanned with good linearity ($R^2 = 0.999$) with overall standard deviation of the line of $< 2\%$.

WO 02/052051

PCT/US02/01541

Fig. 12 is the bar analysis of the data shown in Fig. 10 using the standard curve constructed in Fig. 11b is illustrated. Each spectrum for the 88 samples from Fig. 10 was normalized to the equine β_{2m} signal through baseline integration, and the normalized integral for the human β_{2m} signal determined. The human β_{2m} integrals for the same individual were averaged and the standard deviation calculated. The values of the averaged integrals were substituted in the equation derived from the standard curve and the concentration of human β_{2m} was calculated for each individual. The range of concentrations determined was from 0.75 to 1.25 mg/L.

WO 02/082051

PCT/US02/01541

EXAMPLE 23

*Integrated combined system approach incorporating high throughput affinity
 retrieval with bioactive array MALDI-TOF analysis for point mutations*

Fig. 13 is the qualitative high-throughput screening of transthyretin (TTR) for
 5 posttranslational modification (PTM) and point mutations (PM) was performed using
 the integrated system and methods described herein. Aliquots of diluted (5-fold)
 human plasma samples collected from six individuals were prepared for parallel
 screening on a 96-well plate. Each well received a 15 μ L plasma aliquot (the samples
 from the six individuals were randomized on the 96-well plate), and 135 μ L of HBS
 10 buffer. Parallel sampling processing entailed simultaneous incubation/capture of the
 96 samples on 96 anti-TTR derivatized microcolumns. The polyclonal anti-TTR
 microcolumns were made via glutaraldehyde-mediated coupling of the antibodies to
 amino-contd/modified microcolumns. Captured proteins were eluted from the
 microcolumn array with a small volume of MALDI matrix (saturated ACQA solution)
 15 and stamped onto a MALDI target array surface comprised of self-assembled
 monolayers (SAM) chemically masked to make hydrophilic/hydrophobic contrast
 targets. Each sample spot on the target array was analyzed using mass spectrometry
 and the relative TTR abundance determined by an automated MALDI-TOF mass
 spectrometric analysis software routine. The mass spectra resulting from the high-
 20 throughput analysis of the 96 samples are shown in Fig. 13. In all of the spectra, the
 TTR signal is accompanied by another signal at higher mass, indicating
 posttranslationally processed TTR form. In addition, all spectra resulting from the
 analysis of one plasma sample showed two additional signals at masses ~30 Da higher
 than the two "original" TTR signal. See Figs. 15 and 16 for identification of these
 25 peaks.

Fig. 14 is the identification of the posttranslational modifications and point
 mutations observed in the high-throughput TTR analysis was performed using the
 integrated system and methods described herein. Shown are representative spectra
 resulting from analysis of samples from two individuals, showing the existence of two
 30 and four TTR signals, respectively. In the upper spectrum, two signals attributable to
 TTR are observed. The signals correspond well to the theoretically calculated mass
 of TTR ($MW_{TTR}=13,762$) and that of an oxidized TTR variant (TTR_{ox}) resulting from

WO 02/082051

PCT/US02/01543

cysteinylation at Cys10 (introducing a mass shift of +119 Da). In the lower spectrum, in addition to the above-mentioned two TTR signals, two additional peaks at masses ~30 Da higher than the two "original" TTR signal are observed. See Figs. 15 and 16 for identification of these two peaks.

Continued analysis of the TTR point mutation, displayed in Fig. 15, is illustrated using combined high-throughput affinity retrieval in concert with derivatized mass spectrometer target array in the system platform and the methods described in the present invention. The samples used were the same ones utilized for Fig. 14. TTR from diluted (50-fold, in HBS) human plasma was captured via polyclonal anti-TTR microcolumns, as described for Fig. 13. Instead of matrix elution, the captured proteins were eluted with a small volume of 10 mM HCl onto trypsin-conjugated targets containing buffered target spots (50 mM TRIS buffer pH 9.5) for sample pH modulation (buffer exchange). Shown in this figure are mass spectra resulting from a twenty-minute trypsin digest done at 40 °C of the proteins eluted from the anti-TTR microcolumns. The resulting two tryptic peptide maps localize the mutation in the tryptic fragment-12 (T₁₂), containing residues 104-127. A database search points to two possible TTR mutations in this region of the sequence: Ala109→Thr [DNA base change GCC→ACC], Δm = 30.011 Da, and Thr119→Met [DNA base change ACG→ATG], Δm = 29.992 Da. The identification of the correct mutation is shown in Fig. 16.

Fig. 16 is the high-resolution reflection mass spectrometry used in determining the identity of the point mutations detected in the analysis of the plasma samples shown in Fig. 15 forming an integral part of the integrated system and methods described in the present invention. The monoisotopic signal for the tryptic digest fragment T₁₂ (104-127) in normal (native) TTR shows at m/z = 2644.922, denoting Δm = 29.988 Da difference with the monoisotopic signal for the mutant TTR. Accordingly, the point mutation is assigned to Thr119→Met, Δm = 29.992 Da. This TTR point mutation results in a so-called "Chicago prealbumin" variant, a non-amyloid mutation. The results shown in Figs. 13, 14, 15, and 16 in combination illustrate the use of the system and the methods described herein in identifying posttranslational modifications and point mutations via concerted high-throughput screening analyses of biological samples.

WO 02/082051

PCT/US02/01541

EXAMPLE 24

Integrated combined system approach incorporating high throughput affinity retrieval with bioreactive array MALDI-TOF for analysis of posttranslational modification (PTM)

Fig. 17a is representative of the qualitative high-throughput screening for posttranslational modifications present in biological fluid performed using the integrated system and methods described herein. Concerted biological fluid phosphate analysis was performed using chelator affinity pipettes in conjunction with alkaline phosphatase (AP) functionalized target array. Here, chelator affinity pipettes were prepared as previously disclosed in accordance with example 14. Human whole saliva centrifuged and diluted 10 fold was either analyzed in sample or after incubation with metal chelator affinity pipettes. Captured analyte from metal chelator affinity pipettes was then eluted using dilute acid addition to disrupt the chelator/metal/analyte interaction and stamped onto a hydrophilic/hydrophobic contrast target array or alkaline phosphatase functionalized target array. The later incorporated buffer exchange for subsequent phosphate digests. Direct analysis of dilute human saliva significantly lacks proline rich protein-1 (PRP-1), the serine modified phosphate rich protein of interest. The Fig. 17b(2) spectrum denotes metal chelator affinity pipette capture shown as two phosphate rich proteins, PRP-1 and PRP-3. The dephosphorylation mass signature is evident in spectral trace Fig. 17b(3) and complete in Fig. 17b(4). Illustrating multi-analyte detection accompanied by partial and complete dephosphorylation of phospho-proteins captured/digested out of biological fluid for post-translational analysis, such as phosphorylation events.

EXAMPLE 25

Integrated system approach for affinity multi-protein interactions integral in nascent protein complex retrieval with MALDI-TOF analysis

Illustrative in this example is the interaction within proteins that allow for retrieval of the native multi-protein complex present in biological media or biological samples. Demonstrated in Fig. 18 is the multi-protein complex between retinol binding protein (RBP) and transthyretin (TRT) from human plasma samples performed using the integrated system and methods of the present invention. Polyclonal anti-RBP affinity pipettes were formed using glutaraldehyde mediated

WO 02/082051

PCT/US02/01543

amine base support surface coupling. Human plasma was prepared and used as previously described in above examples. MSIA delineates *in vivo* affinity retrieval of RBP and complexed TTR. The multi-protein complex between retinol binding protein (RBP) and transthyretin (TTR) illustrates protein interactions existing in native
 5 protein complexes.

EXAMPLE 26

Integrated system approach incorporating high throughput multi-analyte retrieval and MALDI-TOF analysis

Multi-receptor affinity microcolumn high-throughput approaches are described in this example to illustrate multi-analyte analysis from human plasma samples performed for rapid qualification and semi-quantization using the integrated system and methods of the present invention. Fig. 19 shows simultaneous rapid monitoring of multi-analytes for relative abundance. Amino activated, polyclonal anti- β_2m /CysC/TTR affinity pipettes were used to rapidly capture their respective
 10 analytes out of human plasma as previously described. This then illustrates one of the uses for multi-antibody affinity pipettes to β_2m , CysC and TTR to rapidly monitor for biological fluid level modulation and to quantify a modulated protein event from their normalized relative abundance. Further illustrating one of the uses of affinity pipettes in the integrated system and methods of the present invention for monitoring potential
 15 β_2m /CysC levels in acute phase of viral infection (ca. AIDS) or fibril formation from β_2m or TTR.

Shown in Fig. 20 is the rapid monitoring of extended multi-analyte affinity pipettes in the integrated system and methods of the present invention. Combinations as well as individual polyclonal antibody affinity pipettes incorporating β_2m , TTR, RBP, Cystatin C or CRP were used to capture respective analytes from human plasma (obtained as previously stated in earlier examples). Illustrating another use for multi/single-antibody affinity pipettes to β_2m , CysC, TTR or CRP to rapidly monitor for biological fluid level modulation and to potentially quantify a modulated protein event from their normalized relative abundance. And further illustrates another of the
 20 uses of affinity pipettes for monitoring potential β_2m /CysC levels in acute phase of viral infection (ca. AIDS) or fibril formation from β_2m or TTR.

WO 02/082051

PCT/US02/01541

Given the ability to increase sample throughput, the integration of a high throughput system for mass spectrometric analysis of biomolecules finds increased use in large-scale clinical, diagnostic, and therapeutic efficacy, applications where exceptional qualitative and quantitative accuracy are both needed in biologically important biomolecule analysis out of biological fluids.

As used herein, "affinity microcolumn" refers to a molecular trap contained within a housing.

As used herein, "affinity reagent" refers to a chemical species on the surface of the molecular trap and is chemically activated, or activatable, and to which affinity receptors may be covalently linked.

As used herein, "affinity receptors" refers to atomic or molecular species having an affinity towards analytes present in biological media or biological samples. Affinity receptors may be organic, inorganic or biological by nature, and can exhibit broad (targeting numerous analytes) to narrow (target a single analyte) specificity. Examples of affinity receptors include, but are not limited to, antibodies, antibody fragments, synthetic paratopes, peptides, polypeptides, enzymes, proteins, multi-subunit protein receptors, vitamins, organic molecules, polymers, inorganic molecules, chelators, nucleic acids, aptamers, as well as the below stated receptors.

As used herein, "analyte" refers to molecules of interest present in a biological sample. Analytes may be, but are not limited to, nucleic acids (DNA, RNA), peptides, hormonal peptides, hormones, polypeptides, proteins, protein complexes, carbohydrates or small inorganic or organic molecules having biological function. Analytes may naturally contain sequences, motifs or groups recognized by the affinity receptors or may have these recognition moieties introduced into them via processing such as cellular, extracellular, enzymatic, chemical, and the like.

As used herein, "biological media" or "biological sample" refers to a fluid or extract having a biological origin. Biological media may be, but are not limited to, cell extracts, nuclear extracts, cell lysates and excretions, blood, sera, plasma, urine, sputum, synovial fluid, cerebral-spinal fluid, tears, feces, saliva, membrane extracts, and the like.

As used herein "chemically activate" refers to the process of exposing the affinity reagent to chemicals (or light) in order to subsequently attach (or

WO 02/082051

PCT/US02/01541

photoactivatable) tethering linkers and affinity receptors. Compounds able to activate affinity reagents may be, but are not limited to organic, inorganic, or biological reagents. Often, it is advantageous to activate the affinity reagent using multiple steps including the use of a tethering linker. As used herein, "tethering linker" refers to compounds intermediate to the affinity reagent and the affinity receptor that exhibit the desirable characteristics of being able to be derivatized with high densities of affinity receptor and showing low binding of non-specified compounds. The tethering linker may be intrinsically active or require activation for attachment. Suitable tethering compounds include but are not limited to homo/hetero functional organics, natural and synthetic polymers and biopolymers.

As used herein, "dead volume" refers to the void volume within the molecular trap. As used herein, "low dead volume" refers to the range of 1 nanoliter to 1 milliliter.

As used herein, "high flow properties" refers to a minimum flow rate of 1 microliter per minute. Higher flow rates are considered to fall within the definition of high flow properties.

As used herein, "mass spectrometer" or refers to a device able to volatilize/ionize analytes to form vapor-phase ions and determine their absolute or relative molecular masses. Suitable forms of volatilization/ionization are laser/light, thermal, electrical, atomized/sprayed and the like or combinations thereof. Suitable forms of mass spectrometry include, but are not limited to, Matrix Assisted Laser Desorption/Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS), electrospray (or nanospray) ionization (ESI) mass spectrometry, quadrupole ion-trap, Fourier transform ion cyclotron resonance (FT-ICR), magnetic sector, or the like or combinations thereof mass analyzers.

As used herein, "mass spectrometer target" or "mass spectrometer target array" refers to an apparatus onto or into which one or more analytes are deposited for subsequent mass spectrometric analysis. Generally, targets will accommodate numerous samples and are of various geometrical configurations depending on the nature of the mass spectrometer for which they are designed. Suitable materials for constructing targets include metals, glasses, plastics, polymers, composites, and the like or combinations thereof.

WO 02/082051

PCT/US02/01541

As used herein "molecular trap" refers to a high surface area material having high flow properties and a low dead-volume, with affinity reagents bound to surfaces contained therein. The composition of the high surface area material may be, but is not limited to, crystal, glasses, plastics, polymers, metals or any combination of these materials. For example, these glasses may be silica glasses, borosilicates, sodium borosilicates, and other useful materials.

As used herein, the term "receptor" generally refers to one member of a pair of compounds that specifically recognize and bind to each other. The other member of the pair is termed a "ligand" and includes such things as complexes, protein-protein interactions, multianalyte analyses, and the like. Receptor/ligand pairing may include protein receptor (membranous), and its natural ligand (associated, or other proteins or small molecules). Receptor/ligand pairs may also include antibody/antigen binding pairs, complementary nucleic acid, nucleic acid associating proteins and their nucleic acid ligands such as aptamers and their proteins, metal chelators and metal binding protein ligands, mimic dyes and their protein ligands, organic molecules and their interaction, such as hydrophobic patches, on or with biomolecules, ion exchangers and their electrostatic interaction on or with biomolecules, and the like.

As used herein, "robotics" refers to devices and procedures capable of the unattended processing of samples. Preferably, the robotics operate on numerous samples in parallel to maximize the number of samples processed and analyzed in a given amount of time.

The preferred embodiment of the invention is described above in the Drawings and Description of Preferred Embodiments. While these descriptions directly describe the above embodiments, it is understood that those skilled in the art may conceive modifications and/or variations to the specific embodiments shown and described herein. Any such modifications or variations that fall within the purview of this description are intended to be included therein as well. Unless specifically noted, it is the intention of the inventors that the words and phrases in the specification and claims be given the ordinary and accustomed meanings to those of ordinary skill in the applicable art(s). The foregoing description of a preferred embodiment and best mode of the invention known to the applicant at the time of filing the application has

WO 02/082051

PCT/US02/01541

been presented and is intended for the purposes of illustration and description. It is not intended to be exhaustive or to limit the invention to the precise form disclosed, and many modifications and variations are possible in the light of the above teachings. The embodiment was chosen and described in order to best explain the principles of the invention and its practical application and to enable others skilled in the art to best utilize the invention in various embodiments and with various modifications as are suited to the particular use contemplated.

WO 02/082051

PCT/US02/01541

Claims:

What is claimed is

1. A high throughput integrated system for qualitative and quantitative biomolecules analysis comprising:
 - a) a robotic platform fitted with multiple, spatially arrayed affinity microcolumns,
 - b) a mass spectrometer target having a spatial array corresponding to the same spatial array as the affinity microcolumns, and,
 - c) a mass spectrometer capable of accepting the spatially arrayed target.
2. The system of Claim 1 wherein the spatial array comprises between 4 and 1536 elements.
3. The system of Claim 1 wherein the robotic platform further comprises multiple processing stages.
4. The system of Claim 1 wherein if the affinity microcolumns receive specific biological molecules in a biological media, the specific biological molecules are retrieved via affinity interaction.
5. The system of Claim 1 wherein the mass spectrometer target has enzymatic activity.
6. The system of Claim 1 wherein the mass spectrometer is a matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer.
7. The system of Claim 3 wherein at least one of the multiple processing stages is for the selective isolation of specific biological molecules present in a biological media using affinity microcolumns.
8. The system of Claim 3 wherein at least one of the multiple processing stages is for rinsing the affinity microcolumns free of non-specifically retained compounds.

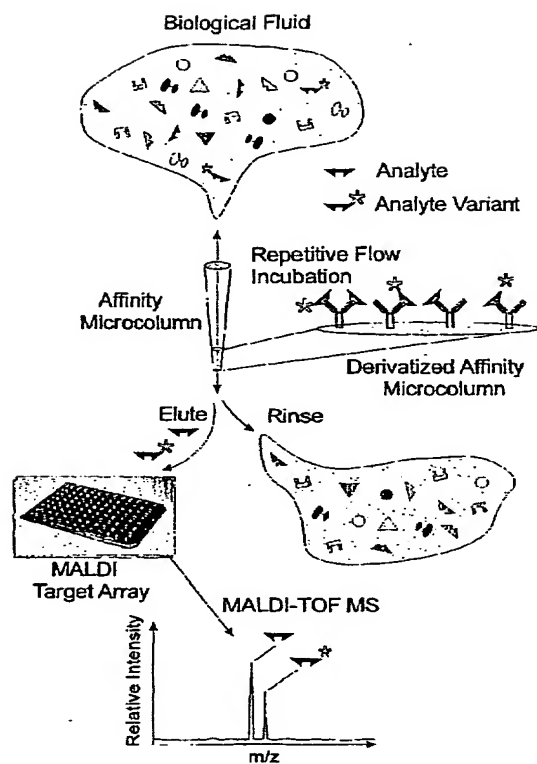
WO 02/082051

PCT/US02/01541

9. The system of Claim 3 wherein at least one of the multiple processing stages is for the disposition of selectively retained biological molecules onto a mass spectrometer target.
10. The system of Claim 1 wherein if multiple different samples of biological media are presented, then they are processed substantially simultaneously and in parallel using the robotic platform fitted with multiple, spatially arrayed affinity microcolumns and the mass spectrometer target having a spatial array corresponding to the same spatial array as the affinity microcolumns.

WO 02/082051

PCT/US02/01543

**Figure 1**

1/21

WO 02/052051

PCT/US02/01541

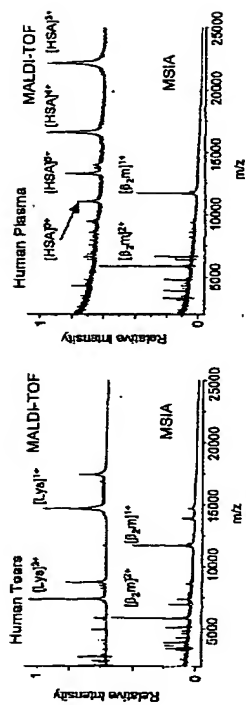


Figure 2a

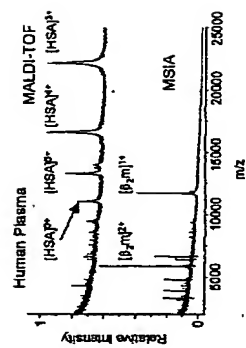


Figure 2b

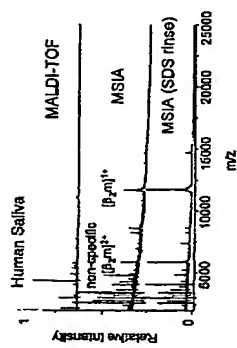


Figure 2c

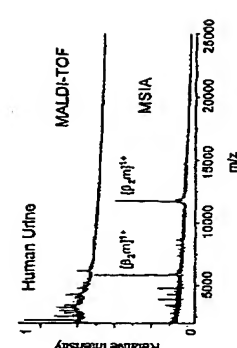


Figure 2d

WO 02/082051

PCT/US02/01541

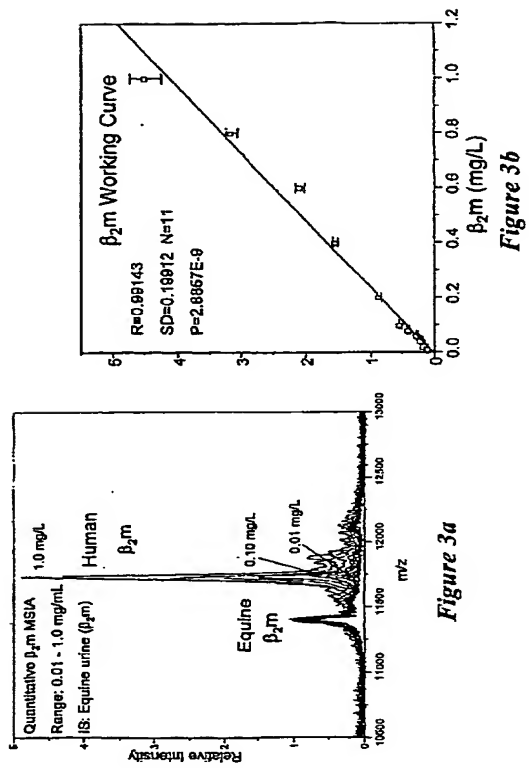


Figure 3a

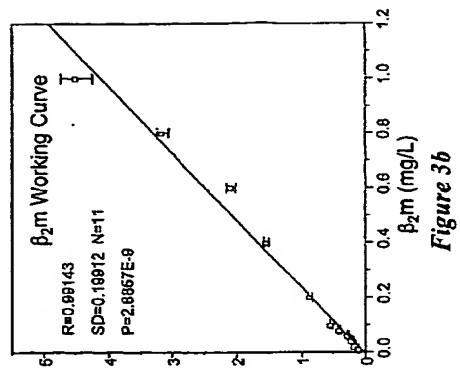


Figure 3b

WO 02/082051

PCT/US02/01541

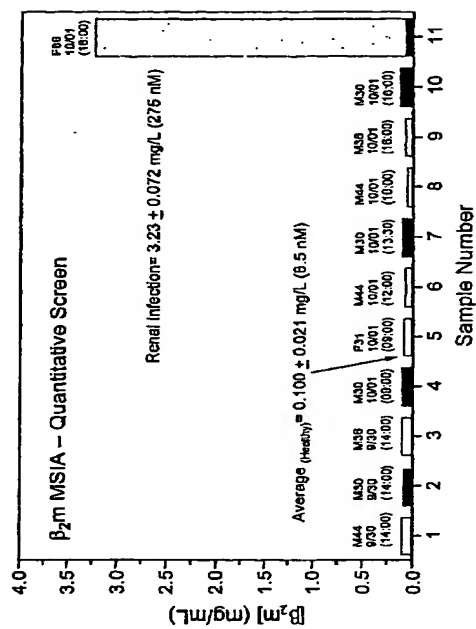


Figure 4

WO 02/092051

PCT/US02/01541

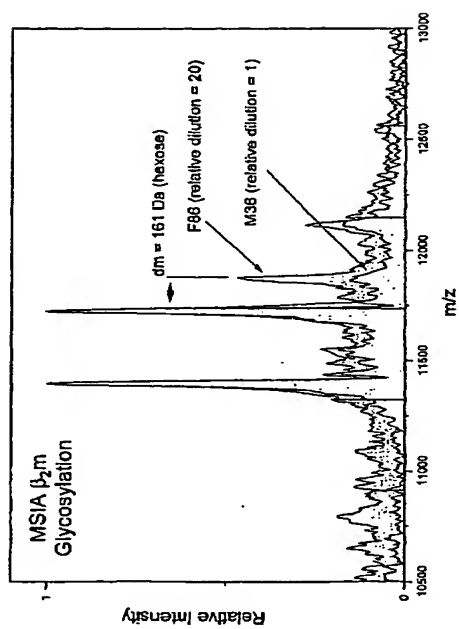


Figure 5

WO 02/082051

PCT/US0201541

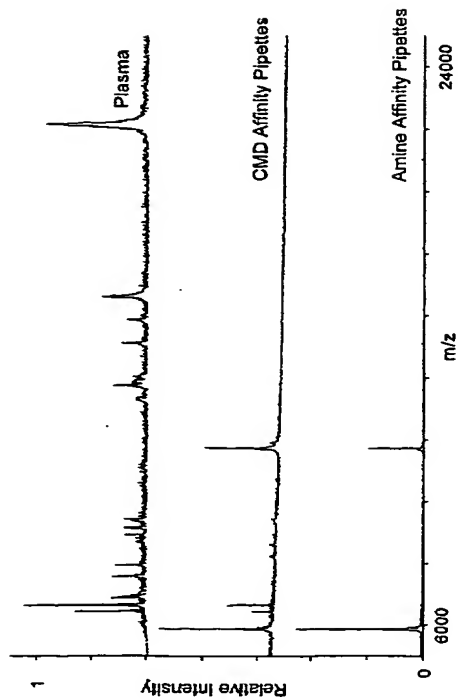
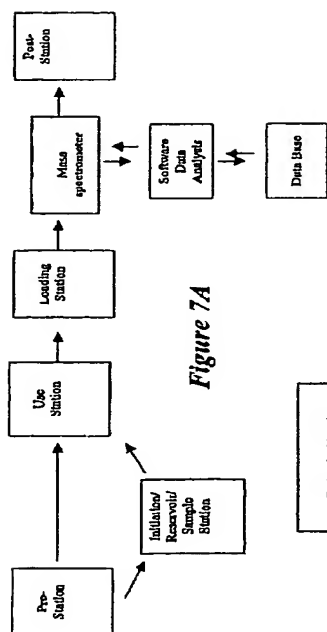


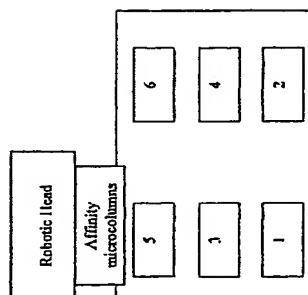
Figure 6

WO 02/082051

PCT/US02/01541

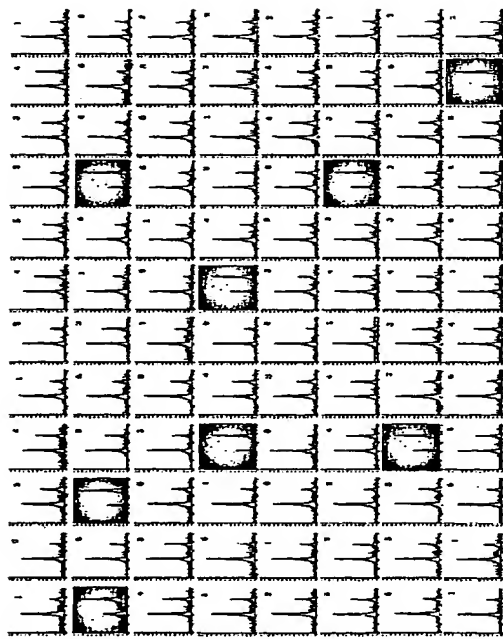


7/21



WO 02/082051

PCT/US02/01541

*Figure 8*

WO 02/082051

PCT/US02/01541

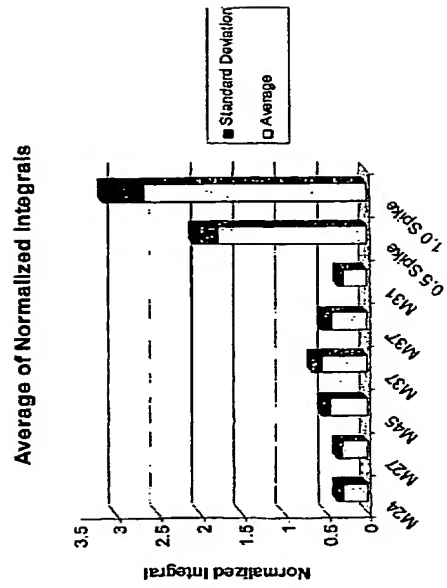
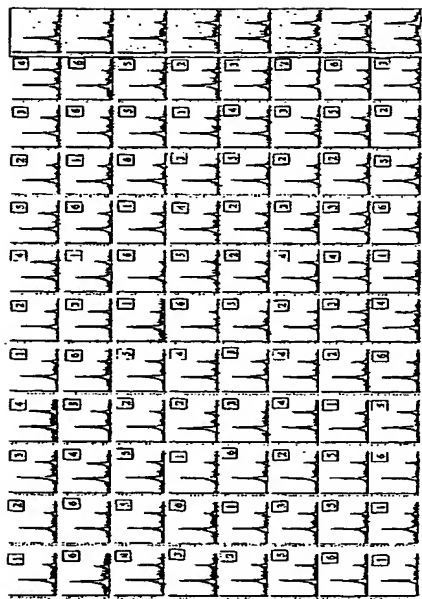


Figure 9

WO 02/082051

PCT/US02/01541

*Figure 10*

WO 02/092051

PCT/US02/01541

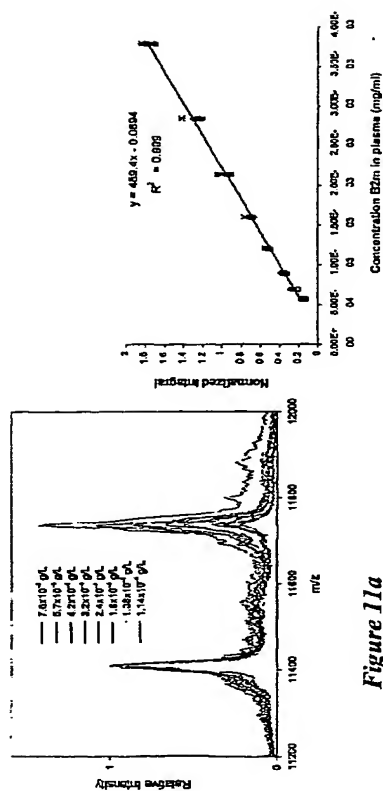


Figure 11a

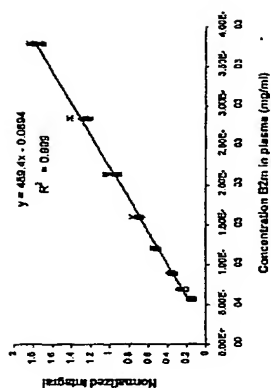


Figure 11b

WO 02/082051

PCT/US02/01541

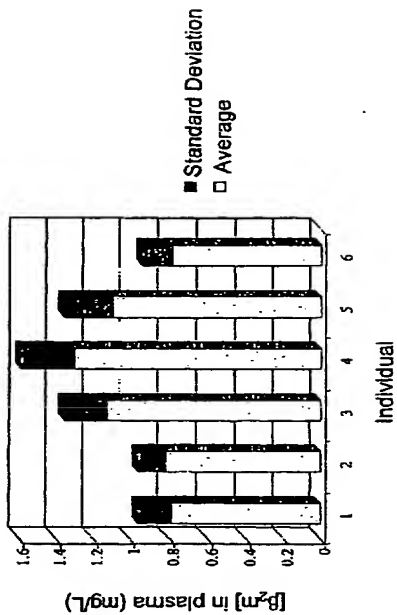
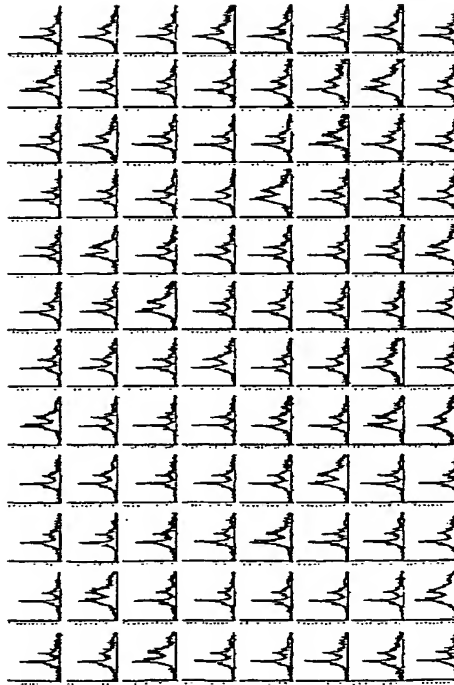


Figure 12

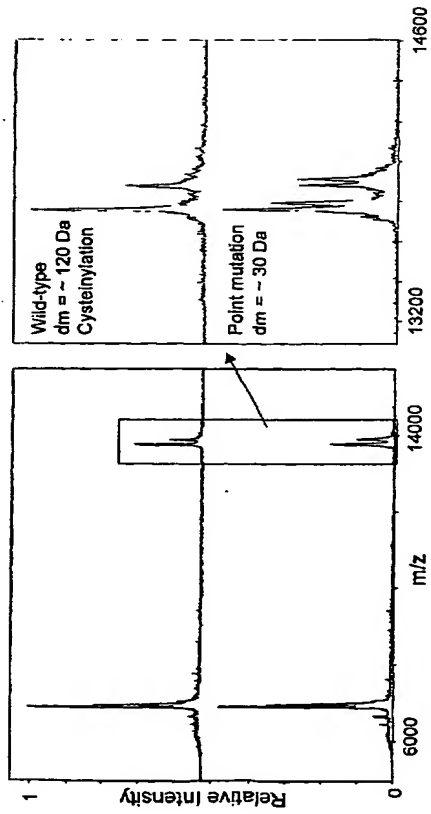
WO 02/082051

PCT/US02/01541

*Figure 13*

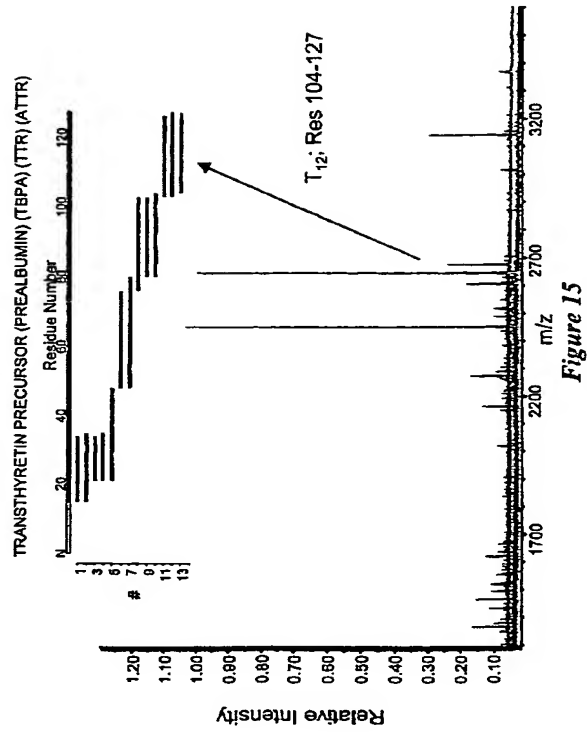
WO 01/0822051

PCT/US02/01541

*Figure 14*

WO 02/092051

PCT/US02/01541



WO 02/092051

PCT/US02/01541

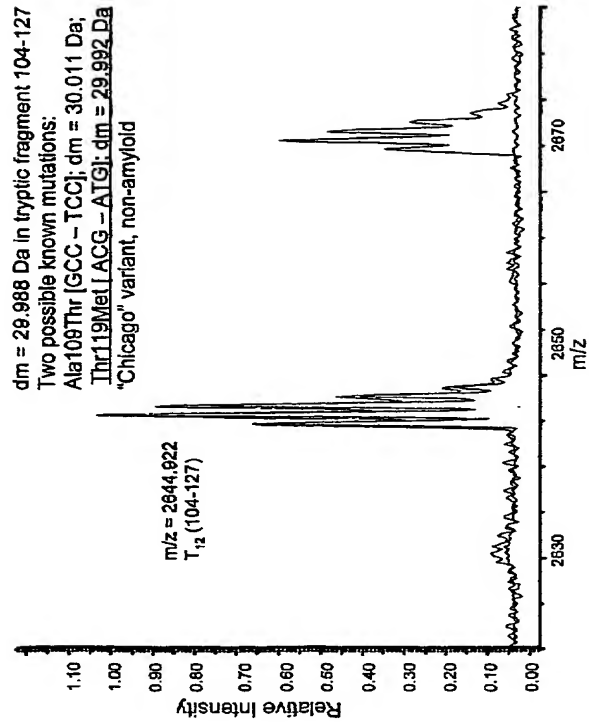


Figure 16

WO 01/082051

PCT/US02/01541

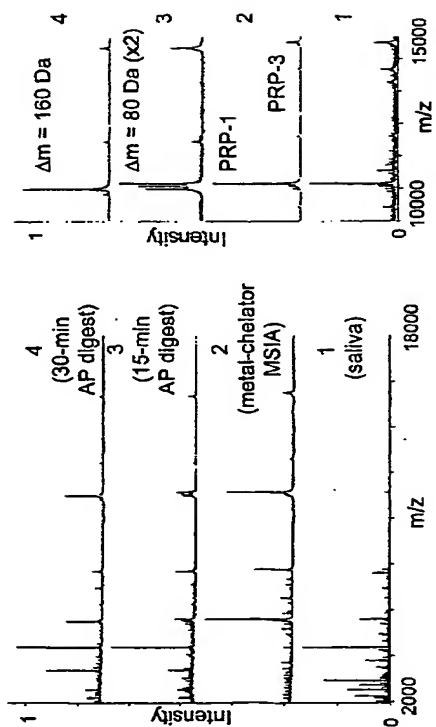


Figure 17A

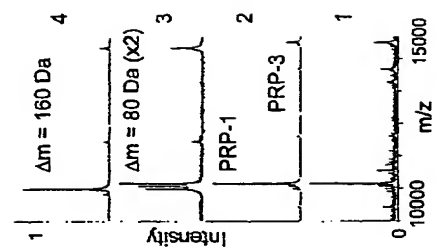


Figure 17B

WO 02/082051

PCT/US02/01541

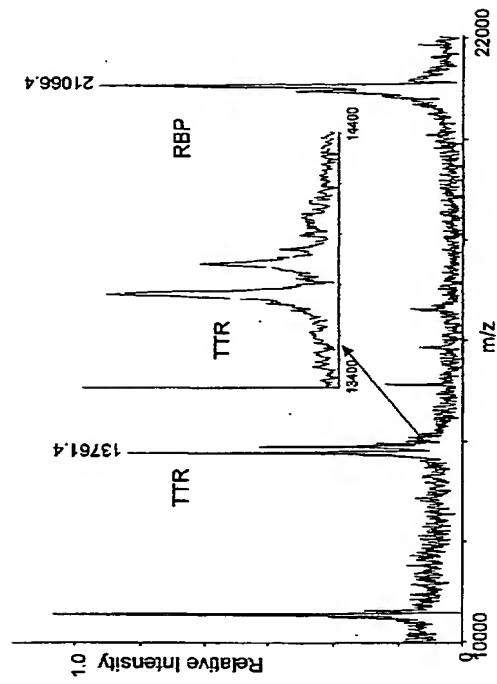


Figure 18

WO 02/082051

PCT/US02/01541

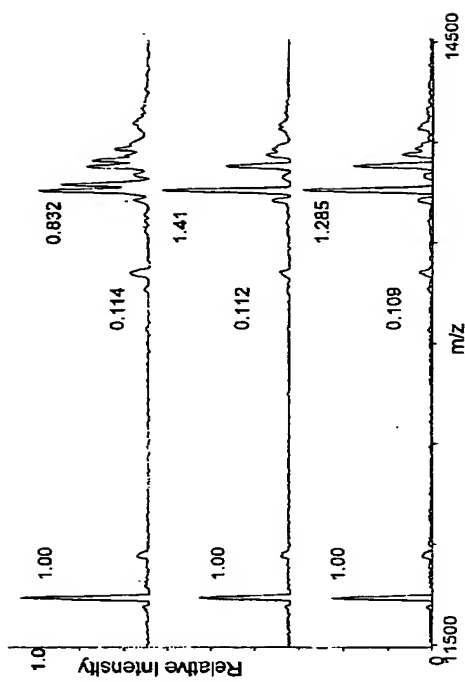


Figure 19

WO 02/082051

PCT/US02/01541

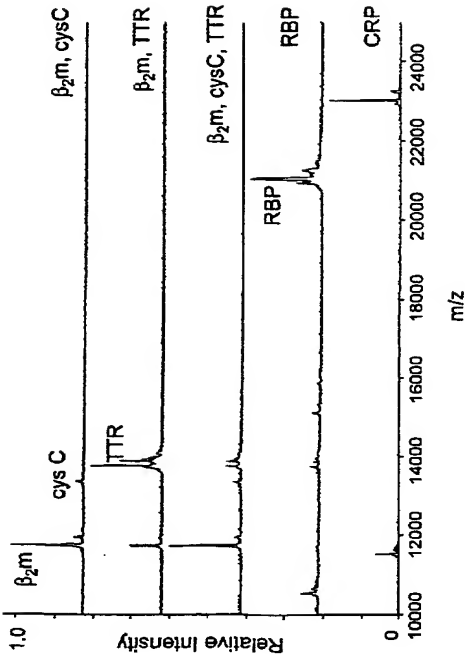
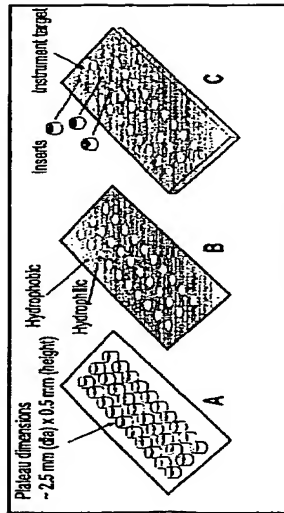


Figure 20

WO 02/082051

PCT/US02/01541

*Figure 21*

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
17 October 2002 (17.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/082051 A3

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68, C12P 19/34, C12M 1/35, G01N 15/06
- (52) International Application Number: PCT/US02/01541
- (53) International Filing Date: 15 January 2002 (15.01.2002)
- (54) Filing Language: English
- (55) Publication Language: English
- (56) Priority Data:
60/262,530 17 January 2001 (17.01.2001) US
60/262,533 17 January 2001 (17.01.2001) US
- (71) Applicant and
(72) Inventor: T. BBS, Newman, A. (US/US), 2327 W. Del
Camp Ave., Mesa, AZ 85202 (US).
- (73) Inventor: N. J. SON, Randall, W.; 11221 S. 51st St.,
85013, Phoenix, AZ 85044 (US); GRUBER, Karl, A.;
19715 N. University, 85411, Tempe, AZ 85281 (US).
- (74) Agent: HAINYORSON, Kristofer, R.; The Hainyerson Law
Firm, S.c., #1, 405 W. Southern Ave., Tempe, AZ 85282
(US).
- (81) Designated States (national): AU, CA, CN, JP, KR, RU.
- (84) Designated States (regional): Eurasia n region (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE,
CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, HU, IT, LI, NL,
PT, SE, TR).
- Published:
— with international search report
- (86) Date of publication of the international search report:
11 March 2002
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Table
once Note on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/082051 A3

(54) Title: AN INTEGRATED HIGH THROUGHPUT SYSTEM FOR THE ANALYSIS OF BIOMOLECULARS

(57) Abstract: The present invention provides an integrated system capable of selectively retrieving and concentrating specific biomolecules from biological media for subsequent high-performance analysis, quantifying targeted proteins, accepting a variety of targeted biomolecules (e.g., splice variants, point mutations and posttranslational modifications) and elucidating their action, analyzing for, and identifying, ligands interacting with targeted biomolecules, and high-throughput screening of large populations of samples using a single, unified, economical, multiplexed and parallel processing platform. The preferred embodiment of the integrated system comprises molecular traps, such as affinity microcolumns, derivatized mass spectrometer targets, mass spectrometers capable of multi-sample input and retrieval with pre-recording data analysis hardware. The present invention also includes methods and processes for use of the individual components and the integrated system in biological applications. Furthermore, the preferred embodiment of the present invention provides for the preparation and/or processing of multiple separate devices and/or samples to accomplish high throughput analysis.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2001/01541
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/68; C12P 19/34; C12M 1/36; G01N 15/06; US CL : 435/6, 7.1, 283.1, 287.2, 422/58.1, 82.05, 82.08, 100 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6, 7.1, 283.1, 287.2, 422/58.1, 82.05, 82.08, 100 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data bases consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EAST, DIALOG		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6,024,925 A (LITTLE et al) 15 February 2000 (15.02.2000) columns 3, 6 & 13-14.	1-10
Y	US 6,083,763 A (BALCH) 04 July 2000 (04.07.2000) columns 12 and 23-30.	1-10
Y	US 6,013,440 A (LIPSHUTZ et al) 11 January 2000 (11.01.2000) columns 8-10.	1-10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family across.		
* Special categories of cited documents: "A" document affecting the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "T" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may have priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date defined "F" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application for effect as to treatment for principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered or involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other cited documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 September 2002 (25.09.2002)		Date of mailing of the international search report 12 DEC 2002
Name and mailing address of the ISA/US Comptroller of Patents and Trademarks Receivable Washington, D.C. 20531 Postoffice Box. (703) 303-3200		Authorized officer R. Patricia Lawrence for SI - PCT/US Telephone No. (703) 303-6196

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 30/50	G 0 1 N 30/46	G
G 0 1 N 30/72	G 0 1 N 30/48	R
G 0 1 N 30/84	G 0 1 N 30/50	
	G 0 1 N 30/72	G
	G 0 1 N 30/84	E
	G 0 1 N 30/84	Z

(特許庁注：以下のものは登録商標)

パイレックス

テフロン

(72)発明者 ネルソン, ランドール ダブリュー.

アメリカ合衆国, アリゾナ州 85044, フェニックス #3013, サウス フィフティーフ
アースト ストリート 11221

(72)発明者 グルーバー, カール エー.

アメリカ合衆国, アリゾナ州 85281, テンペ, イースト ユニヴァーシティー #241
1975